

ANTICUERPOS DE UNIÓN A CD30 Y CD3

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos que se unen a CD30 y CD3. La invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos, células hospedantes que producen los anticuerpos, métodos de producción de los anticuerpos y usos de los anticuerpos, en particular, para tratamiento contra el cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El CD30, también conocido como Ki-1 o TNFRSF8, es un receptor glicoproteico transmembrana de 120 kD y pertenece a la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR, por sus siglas en inglés) (Smith *et al.* (1994) "Cell" 76: 959-962). El CD30 es una proteína de membrana de tipo I unipaso con seis repeticiones ricas en cisteína en su dominio extracelular (Durkop *et al.* (1992) "Cell" 68: 421-427). Además, se ha detectado una forma soluble de CD30 (sCD30) en el suero de pacientes con enfermedades inflamatorias, incluida la colitis ulcerosa (UC) (Giacomelli *et al.* "Clin Exp Immunol." 1998;111:532-5), y las neoplasias hematológicas CD30 positivo (Josimovic-Alasevic *et al.* (1989) "Eur J Immunol"). El sCD30 representa el producto de escisión de la porción extracelular de CD30 por metaloproteinasas ancladas a la membrana celular como TACE/ADAM17 y ADAM10 (Nagata *et al.*, PNAS 2005; Hansen *et al.*, FASEB, 2004).

En tejidos normales, la expresión de CD30 está restringida principalmente a subconjuntos de linfocitos T y B activados (Bowen *et al.* (1996) "J Immunol." 156:442-9; Shanebeck *et al.* (1995) "Eur J Immunol." 25:2147-53). La expresión de CD30 se ha detectado en diversas neoplasias linfoides. El linfoma de Hodgkin clásico (cHL) y el linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) muestran altos niveles de expresión de CD30. En particular, la gran mayoría de las células de Reed-Sternberg (RS) que suelen encontrarse en el cHL, son positivas para CD30 (Frizzera *et al.* (1992) "Semin. Diagn. Pathol." 9: 291-296).

Por ejemplo, el conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a CD30 brentuximab vedotin (BV; SGN-35) fue usado o se sugirió su uso en el tratamiento de cánceres tales como cHL, ALCL y CTCL (Younes *et al.* "J Clin Oncol." del 20 de junio de 2012; 30(18):2183-9; Pro *et al.* "Blood" del 21 de diciembre de 2017; 130(25):2709-2717; Shea *et al.* "Curr Hematol Malig Rep." de febrero de 2020; 15(1):9-19). El anticuerpo tetravalente biespecífico CD30xCD16A AFM13 se está desarrollando como inmunoterapia mediada por células NK para el cHL y el linfoma CD30 positivo (Rothe *et al.* "Blood" del 35 de junio de 2015; 125(26):4024-31).

Además, se están desarrollando tratamientos con células CAR-T dirigidas a CD30 para el linfoma cHL y CD30 positivo. Se han descrito otros anticuerpos CD30 en los documentos WO2003059282 (Medarex), US8257706 (Seattle Genetics), US20100239571 (Seattle

Genetics) WO2007040653 (US Government & Health) y WO20160177846 (Affimed).

Pohl *et al.* ("1993 Int. J. Cancer", 54: 820-827) describen el anticuerpo biespecífico CD3xCD30 OKT-3/HRS-3 que se generó por fusión de células de hibridoma productoras del anticuerpo monoclonal CD30 HRS-3 con células de hibridoma productoras del anticuerpo monoclonal CD3 OKT-3 (tecnología de hibridoma híbrido).

El documento WO2008119567 describe la generación y caracterización de moléculas monocatenarias biespecíficas específicas de especies cruzadas de CD30 y CD3.

El documento US20200095330 describe anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 resultantes de la heteroconjugación química de dos clones anti-CD30 (denominados 8D10 y 10C2) con anti-CD3 (Orthoclone OKT-3).

Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 fue probado en un entorno clínico.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar el tratamiento contra el cáncer dirigido a CD30. Se necesitan compuestos dirigidos a CD30 que sean eficaces, seguros, fáciles de producir y/o de larga duración.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos de unión a linfocitos T que se unen a CD30 y CD3 humanos y de mono cynomolgus. Los inventores han descubierto que algunos anticuerpos de unión a CD30 se unen bien a células que expresan CD30 en un formato bivalente (monoclonal) pero presentan una unión y una citotoxicidad fuertemente reducidas en un formato biespecífico con unión a CD30 monovalente. Se identificaron anticuerpos biespecíficos con una fuerte unión a CD30 monovalente, así como una excelente eliminación de células tumorales. Además, se identificó un anticuerpo biespecífico con una estructura Fc funcionalmente inactiva que es adecuada para el desarrollo de un producto farmacéutico, debido a su excelente estabilidad y solubilidad.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende: (i) una región de unión a CD30 que comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 1, 2 y 3, respectivamente, y una primera región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 4, 5 y 6, respectivamente, y (ii) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 7, 8 y 9, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente.

En otro aspecto, la invención se refiere a una construcción de ácido nucleico, o una combinación de construcciones de ácido nucleico, que codifica un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención.

En otros aspectos, la invención se refiere a un vector de expresión o un vehículo de

administración que comprende una o más construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedante recombinante capaz de producir el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en la que la célula hospedante comprende una o más construcciones de ácido nucleico que codifican el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otros aspectos, la invención se refiere al anticuerpo multiespecífico, las construcciones de ácido nucleico, el vehículo de administración o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como medicamento, por ejemplo en el tratamiento contra el cáncer.

Incluso en otros aspectos, la invención se refiere a métodos para producir anticuerpos multiespecíficos de acuerdo con la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 y sus homólogos mono-específicos bivalentes CD3 y CD30 a células SU-DHL-1 o HDML-2. Unión dependiente de la dosis de (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR, e IgG1-CD30-MDX060-FEAR, (B) bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, e IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, e IgG1-CD30-HRS-3-FEAR, (D) BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, e IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, e IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, e IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, e IgG1-CD30-T408-FEAR, y (H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, e IgG1-CD30-HRS-3-FEAR a células SU-DHL-1 (paneles de la izquierda) o células HDLM-2 (paneles de la derecha). (I) Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 y anticuerpos mono-específicos CD30 a células SU-DHL-1 (paneles de la izquierda) o HDLM-2 (paneles de la derecha) a una concentración de 1,11 µg/ml. Los clones de anticuerpos utilizados para el brazo CD30 se indican en el eje x. Los datos mostrados son valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo, para un experimento representativo.

Figura 2: Unión de bsG1-huCD3xCD30-MDX060 a las líneas celulares HL y ALCL. Se evaluó la unión de bsG1-huCD3xCD30-MDX060 a células (A) HDLM-2 (HL), (B) L-428 (HL), (C) DEL (ALCL) o (D) KI-JK (ALCL) mediante citometría de flujo. Se incluyeron anticuerpos biespecíficos bsG1-huCD3xb12 y bsG1-b12xCD30-MDX060 y anticuerpos mono-específicos

IgG1-CD30-MDX060, IgG1-huCD3 e IgG1-12 como controles. Todos los anticuerpos contenían las mutaciones FEAL y/o FERR de silenciamiento Fc y tecnología DuoBody® en su dominio Fc, como se indica. Los datos mostrados son valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo, para un experimento representativo.

Figura 3: Inducción de citotoxicidad *in vitro* por anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en células SU-DHL-1 o HDML-2. Se sometieron a ensayo anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en una prueba de citotoxicidad *in vitro* utilizando las células SU-DHL-1 de líneas celulares tumorales CD30 positivo (paneles de la izquierda) o células HDLM-2 (paneles de la derecha) como células diana y linfocitos T (células efectoras ADCC CD3 positivo de tipo IV; Clean Cells, Montaigu, Francia) como células efectoras. Se sometieron a ensayo los siguientes anticuerpos: (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR, e IgG1-CD30-MDX060-FEAR, (B) bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR e IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR e IgG1-CD30-HRS-3-FEAR, (D) BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR e IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR e IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR e IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR e IgG1-CD30-T408-FEAR, o (H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR e IgG1-CD30-HRS-3-FEAR. Se incluyó el anticuerpo bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR como control en todos los experimentos. Los datos mostrados son porcentajes de células viables; los datos de cada gráfico se obtuvieron a partir de un experimento representativo.

Figura 4: Inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T y proliferación de linfocitos T *in vitro* mediante anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en varias líneas celulares de ALCL y HL. Se sometieron a prueba (A-C) anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando diferentes líneas celulares de ALCL y HL como células diana y linfocitos T purificados (A, B) o células efectoras ADCC tipo IV (C) o como células efectoras. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 contenían el brazo Fab huCD3-FEAL o la variante huCD3-H101G-FEAL, que tiene menor afinidad por CD3, y el brazo Fab MDX060-FEAR específico de CD30. Se incluyeron como controles IgG1-huCD3 e IgG1-b12 (A, B) o bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR e IgG1-CD30-MDX060-FEAR (C). Los datos mostrados son porcentajes de células viables; los datos de cada gráfico se obtuvieron a partir de un experimento representativo. (D) Se evaluó el número de células CFSE positivas como medida del recuento absoluto de linfocitos T en los ensayos de citotoxicidad utilizando células HDLM-2 (panel de la izquierda) o células NCEB-1 (panel de la derecha) como células diana.

Figura 5: Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a CD30 humano y de mono cynomolgus de longitud completa transfectados en células Expi293F. (A-C) Unión de anticuerpos CD30 monovalentes y bivalentes a células Expi293F de tipo salvaje (A) o células Expi293F transfectadas transitoriamente con CD30 humano de longitud completa (B) o CD30 de mono cynomolgus (C). Se incubaron células con concentraciones crecientes de los siguientes anticuerpos: IgG1-CD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR,

bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR, y bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR. Los datos se presentan como valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo de dos réplicas técnicas. (D) Unión de los anticuerpos IgG1-CD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR y bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR a linfocitos T humanos o linfocitos T de mono cynomolgus. Los datos se presentan como valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo de un experimento representativo.

Figura 6: Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a CD30 de mono rhesus y CD30 humano de longitud completa transfectados en células Expi293F. Se evaluó la unión de anticuerpos CD30 monovalentes y bivalentes a células Expi293F transfectadas transitoriamente con CD30 humano completo (paneles de la izquierda) o CD30 de mono rhesus (paneles de la derecha) mediante citometría de flujo. Se evaluaron los siguientes anticuerpos: (A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR e IgG1-CD30-hAC10-FEAR, (C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR e IgG1-CD30-HRS-3-FEAR, (D) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR e IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR, (E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR e IgG1-CD30-T405-FEAR, (F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR e IgG1-CD30-T105-FEAR, (G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR e IgG1-CD30-T408-FEAR, o (H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR e IgG1-CD30-HRS-3-FEAR. Se incluyó el anticuerpo bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR como control negativo en todos los experimentos. Los datos mostrados son valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo, para un experimento representativo.

Figura 7: Termoestabilidad de anticuerpos con diferentes mutaciones no activadoras determinada por fluorimetría diferencial de barrido (DSF). Se evaluó la estabilidad conformacional de la proteína a temperaturas crecientes por duplicado mediante DSF. Se muestran las curvas de fusión de los siguientes anticuerpos: (A) IgG1-CD30-MDX060-FEAR a un pH de 7,4, (B) IgG1-CD30-MDX060-FERR a un pH de 7,4, (C) IgG1-huCD3-FEAL a un pH de 7,4, y (D) BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a un pH de 7,4.

Figura 8: Unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a líneas celulares HL.

Se evaluó la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a las líneas celulares HL L-540 (A), KM-H2 (B) y L-1236 (C) mediante citometría de flujo. Se incluyeron como controles los anticuerpos biespecíficos bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR y bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR y los anticuerpos monoespecíficos IgG1-CD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL e IgG1-12-FEAL. Los datos mostrados son valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo, para un experimento representativo.

Figura 9: Unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a líneas celulares ALCL.

Se evaluó la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a las líneas celulares SUP-M2 (A), DL-40 (B), KARPAS-299 (C), L-82 (D), y SR-786 (E) mediante citometría de flujo. Se incluyeron como controles los anticuerpos biespecíficos bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR y bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR y los anticuerpos monoespecíficos IgG1-CD30-MDX060-

FERR, IgG1-huCD3-FEAL e IgG1-12-FEAL. Los datos mostrados son valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo, para un experimento representativo.

Figura 10: Unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a líneas celulares NHL.

Se evaluó la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a las líneas celulares (A) SUP-T1 (TLL), (B) JVM-2 (MCL), (C) HH (CTCL) y (D) NCEB-1 (MCL) mediante citometría de flujo. Se incluyeron como controles los anticuerpos biespecíficos bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR y bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR y los anticuerpos monoespecíficos IgG1-CD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL e IgG1-12-FEAL. Los datos mostrados son valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo, para un experimento representativo.

Figura 11: Unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a CD30 humano de longitud completa y de mono rhesus transfectado en células HEK293.

Se evaluó la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a células HEK293 transfectadas transitoriamente con CD30 humano de longitud completa (A) o CD30 de mono rhesus (B) mediante citometría de flujo. Se incluyó bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR como control negativo. Los datos mostrados son valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) determinados por citometría de flujo, para un experimento representativo.

Figura 12: Unión simultánea de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a linfocitos T y células tumorales.

Se estudió la unión simultánea de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a células tumorales marcadas con fluorescencia y linfocitos T vírgenes mediante citometría de flujo. (A) Los eventos doble positivos se muestran como porcentaje del total de células viables en presencia de 6×10^{-5} a $10 \mu\text{g/ml}$ de bsG1-huCD3FEALxCD30-MDX060-FERR o anticuerpos de control bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1b12FEALxCD30MDX060-FERR, o IgG1-b12-FEAL. El porcentaje de eventos doble positivos en muestras incubadas sin anticuerpo se indica con una línea de puntos. (B) Ejemplo de la estrategia de selección de células doble positivas en muestras incubadas con $0,12 \mu\text{g/m}$ de bsG1huCD3FEALxCD30-MDX060-FERR.

Figura 13: Inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T y activación de linfocitos T *in vitro* mediante anticuerpos biespecíficos CD3xCD30.

Se probó un panel de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando la línea celular tumoral CD30 positivo Karpas-299 como células diana y linfocitos T purificados a partir de capas leucocitarias de donantes humanos sanos como células efectoras. En estos ensayos, se evaluó la expresión de CD25 en células CD4⁺ y CD8⁺ como medida de la activación de linfocitos T. Se sometieron a prueba los siguientes anticuerpos: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR, y bsIgG1-huCD3-

FEALxCD30-T215-FEAR. (A) Valores IC_{50} de citotoxicidad de células Karpas-299 por anticuerpos CD3xCD30. (B) Porcentaje de citotoxicidad máxima de células Karpas-299 por anticuerpos de prueba. (C-F) Valores EC_{50} para la inducción de la expresión de CD25 (C-D) o PD-1 (E-F) en linfocitos T CD4⁺ (C, E) o CD8⁺ (D, F) mediante anticuerpos CD3xCD30. Los datos se obtuvieron a partir de dos experimentos independientes realizados con linfocitos T obtenidos de 6 donantes diferentes. Los valores estadísticos representan el resultado de una prueba de Wilcoxon para pares emparejados entre el clon indicado y bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. NS: No significativo, *: $p < 0,05$.

Figura 14: Citotoxicidad mediada por linfocitos T de líneas celulares *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. Se sometió a una prueba *in vitro* la citotoxicidad mediada por linfocitos T dependiente de la dosis mediante bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR utilizando líneas celulares tumorales L-428 (A), KM-H2 (B), SUP-M2 (C) o KI-JK (D) como células diana y linfocitos T purificados como células efectoras. Se incluyeron como controles IgG1-huCD3-FEAL, bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR e IgG1-b12-FEAL. Los datos mostrados son porcentajes de células viables; los datos de cada gráfico se obtuvieron de un experimento representativo.

Figura 15: Proliferación de linfocitos T *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en las líneas celulares L-428 y KI-JK. Se evaluó la proliferación de linfocitos T en ensayos de citotoxicidad mediada por linfocitos T utilizando L-428 (A, B) o KI-JK (C, D) como células diana. Se seleccionaron los linfocitos T CD4⁺ (A, C) o CD8⁺ (B, D) con colorante violeta Celltrace diluido y se calculó el índice de expansión, como medida de la proliferación de linfocitos T, utilizando la herramienta de modelado de proliferación de FlowJo.

Figura 16: Expresión del marcador de activación de linfocitos T CD69 *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en las líneas celulares L-428 y KI-JK. Se evaluó la activación de linfocitos T en ensayos de citotoxicidad mediada por linfocitos T utilizando L-428 (A, B) o KI-JK (C, D) como células diana. Se evaluó la expresión del marcador de activación de linfocitos T CD69 en linfocitos T CD4⁺ (A, C) o CD8⁺ (B, D).

Figura 17: Expresión del marcador de activación de linfocitos T CD25 *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en las líneas celulares L-428 y KI-JK. Se evaluó la activación de linfocitos T en ensayos de citotoxicidad mediada por linfocitos T utilizando L-428 (A, B) o KI-JK (C, D) como células diana. Se evaluó la expresión del marcador de activación de linfocitos T CD25 en linfocitos T CD4⁺ (A, C) o CD8⁺ (B, D).

Figura 18: Expresión del marcador de activación de linfocitos T PD-1 *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en las líneas celulares L-428 y KI-JK. Se evaluó la activación de linfocitos T en ensayos de citotoxicidad mediada por linfocitos T utilizando L-428 (A, B) o KI-JK (C, D) como células diana. Se evaluó la expresión del marcador de activación de linfocitos T PD-1 en linfocitos T CD4⁺ (A, C) o CD8⁺ (B, D).

Figura 19: Producción de citocinas y granzima B *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. Se evaluó la concentración de 14 citocinas diferentes (CD40,

IFN γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 , PDL-1, TNF α) y Granzima B en sobrenadantes que se recogieron durante experimentos de citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* utilizando L-428 como células diana. Se muestran las concentraciones de citocinas y granzima B para muestras tratadas con diferentes concentraciones de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR o anticuerpo de control IgG1-b12-FEAL.

Figura 20: Citotoxicidad mediada por linfocitos T y proliferación de linfocitos T *in vitro* mediante bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en relaciones variables entre efector y diana. (A) Se sometió a prueba la citotoxicidad mediada por linfocitos T dependiente de la dosis por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR *in vitro* utilizando células tumorales L-428 como células diana y linfocitos T purificados como células efectoras en relaciones E:T de 1:1, 2:1, 4:1 u 8:1. Se incluyó bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR como anticuerpo de control. Los datos mostrados son porcentajes de células viables, obtenidos de un experimento representativo. (B, C) Se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (B) o CD8⁺ (C) con colorante violeta Celltrace diluido como una medida de linfocitos T en proliferación.

Figura 21: Cinética de la citotoxicidad mediada por linfocitos T y proliferación de linfocitos T *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. (A) Se sometió a ensayo la cinética de la citotoxicidad mediada por linfocitos T mediante bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR *in vitro* utilizando células tumorales L-428 como células diana y linfocitos T purificados como células efectoras en una relación E:T de 4:1. La citotoxicidad se evaluó después de 24, 48 y 72 horas. Se incluyó bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR como control. Los datos mostrados son porcentajes de células viables, obtenidos a partir de un experimento representativo. (B, C) Se seleccionaron los linfocitos T CD4⁺ (B) o CD8⁺ (C) con colorante violeta Celltrace diluido y se calculó el índice de expansión, como medida de la proliferación de linfocitos T en los ensayos de citotoxicidad, utilizando la herramienta de modelado de proliferación de FlowJo.

Figura 22: Citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR y correlación con el nivel de expresión de CD30. Se evaluó la correlación entre la máxima destrucción mediada por linfocitos T (A) o las concentraciones IC₅₀ de citotoxicidad mediada por linfocitos T (B) por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR frente a los niveles de expresión de CD30 en ocho líneas celulares tumorales. Se utilizó una prueba de correlación de rangos de Spearman (software GraphPad Prism) para evaluar la significación estadística del grado de correlación entre la citotoxicidad mediada por linfocitos T (destrucción máxima o IC₅₀) y la expresión de CD30.

Figura 23: Fratricidio de linfocitos T activados por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. Se estimularon linfocitos T aislados de donantes sanos con 1 μ g/ml de anti-CD3 (OKT-3), 1 μ g/ml de anti-CD28 y 0,025 μ g/ml de IL-15 durante 4 días. Una vez confirmada la activación (aumento de CD25), se incubaron los linfocitos T con concentraciones

crecientes de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsIgG1-ctrlxCD30-MDX-060-FERR, bsIgG1-CD3xb12, o IgG1-b12-FEAL durante 48 horas. Se midió el fratricidio de linfocitos T de CD30⁺ activado inducido por BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR como el porcentaje de linfocitos T viables en cada condición en relación con el número de linfocitos T viables en la condición sin añadir ningún anticuerpo. (A-B) Se determinó el porcentaje de células CD25⁺ (A) o CD30⁺ (B) en linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, 72- y 96 horas después de la estimulación con anti-CD3, anti-CD28 e IL-15, mediante citometría de flujo. (C) Se mostró el fratricidio de linfocitos T como el porcentaje de supervivencia de linfocitos T en relación con la condición sin añadir ningún anticuerpo. Se muestran los datos de un donante de linfocitos T representativo.

Figura 24: CD30 soluble en el sobrenadante de cultivos de células CD30⁺ y su interferencia con la actividad antitumoral de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. (A) Se muestra la concentración de CD30 soluble (sCD30) en el sobrenadante de diferentes líneas celulares de tumores hematológicos, calculado mediante ELISA. (B) Se evaluó la correlación entre las concentraciones de sCD30 y el número de moléculas CD30 en la superficie celular, determinada mediante citometría de flujo cuantitativa (kit calibrador de IgG humana Biocytex), en diferentes líneas celulares de tumores hematológicos, mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman (software GraphPad Prism). (C) Se sometió a prueba BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando la línea celular tumoral DEL CD30-positivo para ALCL como células diana y linfocitos T aislados de donantes sanos como células efectoras. Se incluyeron los siguientes anticuerpos de control: BsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, BsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-huCD30-FEAL e IgG1-b12-FEAL. Los datos mostrados son porcentajes de células viables, obtenidos a partir de un experimento representativo.

Figura 25. Inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T y proliferación de linfocitos T *ex vivo* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en células tumorales L-428. (A) Se sometió a prueba bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en un ensayo de citotoxicidad *ex vivo* utilizando células tumorales L-428 como células diana y linfocitos T primarios derivados de pacientes como células efectoras. Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de pacientes con linfoma de Hodgkin (HL), leucemia mieloide aguda (AML) y linfoma periférico de linfocitos T (PTCL) como fuente de linfocitos T para evaluar la destrucción de células tumorales dependientes de CD3. Se incluyó IgG1-b12-FEAL como control. Los datos mostrados son el porcentaje de células diana viables. (B-D) Se evaluó la activación de linfocitos T mediante la regulación en alza de los marcadores CD69 (B), CD25 (C) y PD-1 (D) en linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ dentro del subconjunto de PBMC, indicada como porcentaje de células positivas.

Figura 26. Concentraciones plasmáticas de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR después de la inyección intravenosa en ratones SCID. Se les inyectó a ratones SCID una dosis intravenosa única de 10 µg (0,5 mg/kg) o 100 µg (5 mg/kg) de BsG1-huCD3-

FEALxCD30-MDX060-FERR. (A) Se determinó la IgG humana total mediante ELISA y se trazaron las concentraciones medias de IgG1 humana en el curso del tiempo. (B) Se trazó la tasa media de eliminación para niveles de dosis de 0,5 o 5 mg/kg. La línea de puntos indica la tasa de eliminación estimada basada en el volumen de distribución estándar de una IgG1 humana regular sin unión en ratones.

Figura 27: Unión de C1q al bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR unido a membrana. Se evaluó la unión de C1q a bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-opsonizadas, linfocitos T CD8⁺ humanos activados o células NCEB-1 CD30⁺ mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-C1q de conejo marcados con FITC. (A) Unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL o anticuerpo de control positivo IgG1-CD52-E430G a linfocitos T CD8⁺ humanos estimulados con microesferas anti-CD3/CD28 en presencia de suero humano normal como fuente de C1q. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia de media geométrica (gMFI) $\pm$ SD de pocillos replicados de un experimento representativo. B) Unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR o anticuerpo de control positivo IgG1-7D8-E430G a células CD30⁺ NCEB-1, en presencia de suero humano normal como fuente de C1q. Los datos mostrados son gMFI de un experimento representativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, pretende hacer referencia a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de ellos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas y/o específicas de un tumor con una semivida de períodos de tiempo significativos, como al menos alrededor de 30 minutos, al menos alrededor de 45 minutos, al menos alrededor de una hora, al menos alrededor de dos horas, al menos alrededor de cuatro horas, al menos alrededor de 8 horas, al menos alrededor de 12 horas, al menos alrededor de 24 horas o más, al menos alrededor de 48 horas o más, al menos alrededor de 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período relevante definido funcionalmente (como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o un tiempo suficiente para que el anticuerpo se internalice). Un anticuerpo comprende una región de unión (o dominio de unión, que puede utilizarse en el presente documento, teniendo ambos el mismo significado) que puede interactuar con un antígeno, una región de unión que comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera de una molécula de inmunoglobulina, o similares. Los anticuerpos pueden comprender regiones constantes de los anticuerpos (Abs) que pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedante, incluidas varias células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento como C1q, el primer

componente en la vía clásica de activación del complemento.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" incluye un anticuerpo monoclonal (mAb), un polipéptido similar a un anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, así como un "fragmento de anticuerpo" o un "fragmento del mismo" que conserve la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmento de unión a antígeno) proporcionado por cualquier técnica conocida, como la escisión enzimática, la síntesis de péptidos y la tecnología del ADN recombinante. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos bi-, tri- o multispecíficos y/o anticuerpos con modificaciones adicionales, por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco y/o anticuerpos con modificaciones en el dominio IgG Fc. Un anticuerpo tal como se define de acuerdo con la invención puede poseer cualquier isotipo o no tener isotipo (por ejemplo, un anticuerpo scFv), a menos que la descripción del presente documento esté limitada de otro modo.

Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en el término "anticuerpo" se incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente compuesto por los dominios variables de cadena ligera (VL), variable de cadena pesada (VH), región constante de cadena ligera (CL) y región constante de cadena pesada dominio 1 (CH1), o un anticuerpo monovalente como el descrito en el documento WO 2007/059782; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb según Ward *et al.*, "Nature" 341, 544546 (1989), que consiste esencialmente en un dominio VH y también se denomina anticuerpo de dominio según Holt *et al.*; "Trends Biotechnol" de noviembre de 2003; 21(11):484-90; (vi) camélidos o nanocuerpos según Revets *et al.*; "Expert Opin Biol Ther." enero de 2005; 5(1):111-24 y (vii) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite producirlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena única o Fv de cadena única (scFv), referirse por ejemplo a Revets *et al.*; "Expert Opin Biol Ther." enero de 2005; 5(1):111-24 y Bird *et al.*, "Science" 242, 423426 (1988). Tales anticuerpos de cadena simple se incluyen en el término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o esté claramente indicado por el contexto. Aunque tales fragmentos se incluyen en general dentro del significado de anticuerpo, en forma colectiva y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, exhibiendo diferentes propiedades biológicas y de utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se tratan en mayor detalle en el presente documento.

Un anticuerpo, ya sea como producto final o como intermedio para generar, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico mediante intercambio controlado de brazo Fab (cFEA), puede producirse y recogerse de diferentes sistemas de expresión o producción *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, a partir de células hospedantes modificadas de forma recombinante, de hibridomas o de sistemas que utilizan extractos celulares que soportan la transcripción y/o traducción *in vitro* de secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo.

La expresión "cadena pesada de inmunoglobulina" o "cadena pesada de una inmunoglobulina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina. Una cadena pesada se compone típicamente de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada (abreviada en el presente documento como CH) que define el isotipo de la inmunoglobulina. La región constante de la cadena pesada de un IgG se compone típicamente de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. El término "inmunoglobulina", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que suelen consistir en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro potencialmente interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada (referirse, por ejemplo, a "Fundamental Immunology", capítulo 7, (Paul, W., 2º ed., Raven Press, N.Y., (1989))). Dentro de la estructura de la inmunoglobulina, las dos cadenas pesadas están interconectadas mediante enlaces disulfuro en la denominada "región bisagra". Al igual que las cadenas pesadas, cada cadena ligera se compone normalmente de varias regiones: una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone normalmente de un dominio, CL. Además, las regiones VH y VL pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o forma de bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde un extremo amino-terminal hasta un extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En el presente documento, las expresiones "media molécula", "brazo Fab" y "brazo" se refieren al par cadena pesada-cadena ligera. Cuando se describe que un anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo de media molécula "derivado de" un primer anticuerpo, y un anticuerpo de media molécula "derivado de" un segundo anticuerpo, la expresión "derivado de" indica que el anticuerpo biespecífico se generó recombinando, a través de cualquier método conocido, dichas medias moléculas de cada uno de dichos primer y segundo anticuerpos en el anticuerpo biespecífico resultante. En este contexto, el término "recombinación" no pretende limitarse a ningún método particular de recombinación y, por lo

tanto, incluye todos los métodos para producir anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, la recombinación por intercambio de medias moléculas, así como la recombinación a nivel de ácido nucleico y/o mediante la coexpresión de dos medias moléculas en las mismas células.

Los términos "primero" y "segundo", cuando se utilizan en el presente documento en el contexto de un anticuerpo o dominio o región del mismo, se utilizan simplemente para facilitar la referencia y no pretenden indicar una ubicación relativa particular o similar.

La expresión "región de unión al antígeno" o "región de unión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno. El antígeno puede ser cualquier molécula, como un polipéptido, una proteína, un polisacárido o una combinación de los mismos. Los antígenos pueden, por ejemplo, presentarse en una célula, bacteria o virión. Los términos "antígeno" y "diana" pueden utilizarse indistintamente en el contexto de la presente invención, a menos que el contexto lo indique de otra manera. Las expresiones "región de unión a antígeno" y "sitio de unión a antígeno" pueden utilizarse indistintamente en el contexto de la presente invención, a menos que el contexto lo contradiga.

El término " K_D " (M), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, y se obtiene dividiendo k_d por k_a . K_D también puede denominarse "afinidad de unión".

El término " k_d " (seg^{-1}), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Dicho valor también se denomina valor k_{off} o velocidad de disociación.

El término " k_a " ($\text{M}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno. Dicho valor también se denomina valor k_{on} o velocidad de activación.

El término "unión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno o diana predeterminados, normalmente con una afinidad de unión correspondiente a una K_D de 1E^{-6} M o menos, por ejemplo 5E^{-7} M o menos, 1E^{-7} M o menos, tal como 5E^{-8} M o menos, tal como 1E^{-8} M o menos, tal como 5E^{-9} M o menos, tal como 1E^{-9} M o menos, tal como 1E^{-10} M o menos o tal como 1E^{-11} M o menos, cuando se determina por interferometría de biocapa utilizando el anticuerpo como ligando y el antígeno como analito y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces inferior, por ejemplo, al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, por ejemplo, al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o de un antígeno estrechamente relacionado.

El término "CD30" de la forma utilizada en el presente documento se refiere a la proteína humana del grupo de diferenciación 30, también conocida como TNFRSF8 (Receptor

del factor de necrosis tumoral, miembro de la superfamilia 8). El CD30 se encuentra en varias especies, por lo que el término "CD30" puede no limitarse a CD30 humano, a menos que el contexto lo contradiga. La secuencia de CD30 humano se establece en SEQ ID N.º 39.

El término "CD3", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína humana del grupo de diferenciación 3, que forma parte del complejo de proteínas correceptoras de linfocitos T y está compuesta por cuatro cadenas distintas. La CD3 se encuentra en varias especies y, por lo tanto, el término "CD3" puede no limitarse al CD3 humano, a menos que el contexto lo contradiga. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ (gamma) (cadena CD3 γ humana UniProtKB/Swiss-Prot N.º P09693, o CD3 γ de mono cynomolgus UniProtKB/Swiss-Prot N.º Q95LI7), una cadena CD3 δ (delta) (CD3 δ humano N.º UniProtKB/Swiss-Prot P04234, o CD3 δ de mono cynomolgus N.º UniProtKB/Swiss-Prot Q95LI8), dos cadenas CD3 ϵ (épsilon) (CD3 ϵ humano: UniProtKB/Swiss-Prot N.º P07766, cuya secuencia se incorpora al presente documento como SEQ ID N.º 42; CD3 ϵ de mono cynomolgus UniProtKB/Swiss-Prot N.º Q95LI5; o CD3 ϵ de mono rhesus UniProtKB/Swiss-Prot N.º G7NCB9), y una cadena CD3 ζ (zeta) (CD3 ζ humana UniProtKB/Swiss-Prot N.º P20963, CD3 ζ de mono cynomolgus UniProtKB/Swiss-Prot N.º Q09TK0). Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como receptor de linfocitos T (TCR) y generan una señal de activación en los linfocitos T. Las moléculas TCR y CD3 comprenden juntas el complejo TCR.

La expresión "región de unión al anticuerpo" se refiere a una región del antígeno, que comprende el epítipo al que se une el anticuerpo. La región de unión de un anticuerpo puede determinarse mediante la unión de epítopos utilizando interferometría de bicapa, mediante barrido de alanina o mediante ensayos de transposición de dominio (utilizando construcciones de antígeno en las que se intercambian regiones del antígeno con las de otra especie y determinando si el anticuerpo sigue uniéndose al antígeno o no). Los aminoácidos dentro de la región de unión al anticuerpo que intervienen en la interacción con el anticuerpo pueden determinarse por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio y/o por cristalografía del anticuerpo unido a su antígeno.

El término "epítipo" hace referencia a un determinante antigénico que se une en forma específica a un anticuerpo. Los epítopos suelen consistir en agrupaciones superficiales de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar o una combinación de ellas, y suelen tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes u otros agentes que alteran la estructura tridimensional de una proteína o de un multímero de la misma. El epítipo puede comprender residuos de aminoácidos que intervienen directamente en la unión y otros residuos de aminoácidos que no intervienen directamente en la unión, como residuos de aminoácidos que el anticuerpo bloquea o cubre eficazmente cuando se une al antígeno.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal", "Ab monoclonal", "composición de anticuerpo monoclonal", "mAb", o similares, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única y suele mostrar una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Un anticuerpo monoclonal puede producirse típicamente mediante células idénticas que son todas clones de una única célula madre, como por ejemplo hibridomas, líneas celulares estables o similares. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden producirse mediante un hibridoma que incluya un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico, con un genoma que comprenda un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionado a una célula inmortalizada. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden derivar de linfocitos B o células plasmáticas humanas. Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse a partir de células hospedantes modificadas de forma recombinante, o sistemas que utilizan extractos celulares que soportan la transcripción y/o traducción *in vitro* de secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo.

El término "isotipo" utilizado en el presente documento se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) o cualquiera de sus alotipos, tal como IgG1m(za) e IgG1m(f)) codificada por genes de la región constante de la cadena pesada. Además, cada isotipo de cadena pesada puede combinarse con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

La expresión "anticuerpo de longitud completa", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo original o variante) que comprende un par de cadenas pesadas y ligeras o dos pares de cadenas pesadas y ligeras, cada par contiene dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera como los que se encuentran normalmente en un par de cadena pesada-cadena ligera de un anticuerpo de tipo salvaje de ese isotipo. De esta manera, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 de longitud completa contiene los dominios VH, CH1, CH2, CH3, bisagra, VL y CL. En una variante de anticuerpo de longitud completa, los dominios constante y variable de las cadenas pesada y ligera pueden contener, en particular, sustituciones de aminoácidos que modifican y/o mejoran las propiedades funcionales del anticuerpo en comparación con el anticuerpo de longitud completa original o de tipo salvaje. Un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la presente invención puede producirse a través de un método que comprende los pasos de (i) clonar las secuencias CDR en uno o más vectores adecuados que comprenden secuencias completas de cadena pesada y ligera, y (ii) expresar los vectores adecuados obtenidos con las secuencias de cadena pesada y ligera en sistemas de expresión adecuados. El experto en la técnica sabe cómo producir un anticuerpo de longitud completa partiendo de

secuencias CDR o de secuencias de región variable completas. De esta manera, el experto conoce cómo generar un anticuerpo de longitud completa de acuerdo con la presente invención.

La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo no humano modificado genéticamente, que contiene dominios constantes de anticuerpos humanos y dominios variables no humanos modificados para contener un alto nivel de homología de secuencia con los dominios variables humanos. Esto puede lograrse injertando regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos no humanos, que juntas forman el sitio de unión al antígeno, en una región marco (FR) aceptora humana homóloga (referirse, entre otros, a los documentos WO92/22653 y EP0629240). Para reconstituir completamente la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo parental, puede ser necesaria la sustitución de algunos de los residuos de la estructura humana por algunos de los residuos de la estructura del anticuerpo parental (es decir, el anticuerpo no humano) (retro-mutaciones). El modelado de homología estructural puede ayudar a identificar los residuos de aminoácidos en las regiones marco que son importantes para las propiedades de unión del anticuerpo. De esta manera, un anticuerpo humanizado puede comprender secuencias CDR no humanas, regiones marco principalmente humanas que opcionalmente comprenden una o más mutaciones retroactivas de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos no humana, y regiones constantes totalmente humanas. Como opción, se pueden aplicar modificaciones de aminoácidos adicionales, que no son necesariamente retromutaciones, para obtener un anticuerpo humanizado con características preferidas, tales como afinidad útil particular y propiedades bioquímicas, por ejemplo, incluir modificaciones para evitar la desamidación y/o mejorar la producción. Además, las CDR y/o las regiones marco pueden modificarse para mejorar la afinidad con el antígeno, por ejemplo mediante procedimientos de maduración de afinidad.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias estructurales humanas. Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluida la metodología de anticuerpos monoclonales convencionales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, "Nature" 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por

ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse usando ratones transgénicos o transcrómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón, tal como un ratón HCo12 (referirse, por ejemplo, al documento WO 03/059282), o similares.

La expresión "región Fc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región que comprende, en la dirección desde los extremos N- a C-terminal de los dos polipéptidos de cadena pesada del anticuerpo, al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3. Los polipéptidos Fc normalmente están glicosilados. Una región Fc del anticuerpo puede mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedante, incluidas diversas células del sistema inmunitario (tales como células efectoras) y componentes del sistema complemento. Las regiones Fc normalmente también se unen a FcRn y a la proteína A.

La expresión "aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición...", o similar, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un número de posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana. Las posiciones de aminoácidos correspondientes en otras inmunoglobulinas se pueden encontrar mediante alineación con la IgG1 humana. A menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran en el presente documento de acuerdo con el índice de numeración EU (descrito en Kabat, E.A. *et al.*, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5.ª edición - Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE. UU., publicación NIH N.º 91-3242, págs. 662, 680, 689). Por lo tanto, un aminoácido o segmento en una secuencia que "corresponde" a un aminoácido o segmento en otra secuencia es aquel que se alinea con el otro aminoácido o segmento usando un programa de alineación de secuencia estándar como ALIGN, ClustalW o similar, típicamente en configuraciones predeterminadas y tiene al menos un 50 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de identidad con una cadena pesada de IgG1 humana. En la técnica, se conoce la forma de alinear una secuencia o segmento en una secuencia y determinar así la posición correspondiente en una secuencia a una posición de aminoácido de acuerdo con la presente invención.

La expresión "región bisagra", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la región bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina. De esta manera, por ejemplo, la región bisagra de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 216-230 de acuerdo con la numeración Eu establecida en Kabat, E. A. *et al.*, "Sequences of proteins of immunological interest", 5.ª edición - Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE. UU., Publicación de NIH N.º 91-3242, páginas 662, 680, 689 (1991). Sin embargo, la región bisagra también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

La expresión "región CH1" o "dominio CH1" utilizada en el presente documento se

refiere a la región CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina. De esta manera, por ejemplo, la región CH1 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 118-215 de acuerdo con la numeración Eu tal como se establece en Kabat (*ibid*). Sin embargo, la región CH1 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

La expresión "región CH2" o "dominio CH2" utilizada en el presente documento se refiere a la región CH2 de una cadena pesada de inmunoglobulina. De esta manera, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 231-340 de acuerdo con la numeración Eu tal como se establece en Kabat (*ibid*). Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

La expresión "región CH3" o "dominio CH3" utilizada en el presente documento se refiere a la región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. De esta manera por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 341-447 de acuerdo con la numeración Eu tal como se establece en Kabat (*ibid*). Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos descritos en el presente documento.

La expresión "funciones efectoras mediadas por Fc", tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a las funciones que son consecuencia de la unión de un polipéptido o anticuerpo a su diana o antígeno en una membrana celular en la que la función efectora mediada por Fc es atribuible a la región Fc del polipéptido o anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras mediadas por Fc se incluyen: (i) unión a C1q, (ii) activación del complemento, (iii) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), (iv) citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), (v) unión al receptor Fc-gamma (FcγR), (vi) entrecruzamiento de antígenos mediado por FcγR dependiente de anticuerpos, (vii) fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), (viii) citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC), (ix) citotoxicidad potenciada por el complemento, (x) unión al receptor del complemento de un anticuerpo opsonizado mediada por el anticuerpo, (xi) opsonización, y (xii) una combinación de cualquiera de los puntos (i) a (xi).

El término "inercia", "inerte" o "no activador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región Fc que no es capaz o tiene una capacidad mínima para unirse a cualquier FcγR, inducir el entrecruzamiento de FcγR mediado por Fc, inducir FcγR-funciones efectoras mediadas como ADCC y ADCP, inducir el entrecruzamiento de antígenos diana mediado por FcγR a través de dos regiones Fc de anticuerpos individuales, y/o no es capaz de unirse a C1q e inducir funciones efectoras mediadas por complementos tales como CDC y CDCC. Se puede someter a prueba la inercia de una región Fc de un anticuerpo usando el anticuerpo en un formato monoespecífico o biespecífico.

La expresión "anticuerpo monovalente", en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula de anticuerpo que puede interactuar con un antígeno, con un solo

dominio de unión al antígeno (por ejemplo, un brazo Fab). En el contexto de un anticuerpo multiespecífico, tal como un biespecífico, la expresión "unión de anticuerpo monovalente" se refiere a la unión del anticuerpo multiespecífico a un antígeno con un solo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un brazo Fab).

La expresión "anticuerpo monoespecífico" en el contexto de la presente invención, se refiere a un anticuerpo que tiene especificidad de unión a un antígeno, un solo epítipo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoespecífico, monovalente (es decir, que porta sólo una región de unión a antígeno), un anticuerpo monoespecífico, bivalente (por ejemplo, un anticuerpo con dos regiones de unión a antígeno idénticas) o un anticuerpo monoespecífico, multivalente (por ejemplo, un anticuerpo con más de dos regiones idénticas de unión a antígeno).

La expresión "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene dos o más dominios de unión a antígeno que se unen a dos o más epítopos diferentes. La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene dos dominios de unión a antígeno que se unen a diferentes epítopos, por ejemplo, dos pares no idénticos de regiones VH y VL, dos brazos Fab no idénticos o dos brazos Fab con regiones CDR no idénticas. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos tienen especificidad por dos o más, respectivamente, epítopos diferentes. Dichos epítopos pueden estar en antígenos o dianas iguales o diferentes. Si los epítopos están en antígenos diferentes, dichos antígenos pueden estar en la misma célula o en diferentes células, tipos celulares o estructuras, tales como matriz extracelular o vesículas y proteína soluble. Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos y biespecíficos pueden ser capaces de entrecruzar múltiples antígenos, por ejemplo, dos células diferentes.

La expresión "anticuerpo bivalente" se refiere a un anticuerpo que tiene dos regiones de unión a antígeno, donde dichas regiones de unión a antígeno pueden ser idénticas y unirse a los mismos epítopos o pueden ser no idénticas y unirse a diferentes epítopos que pueden estar en el mismo epítipo o en antígeno(s) diferente(s). Por lo tanto, un anticuerpo bivalente puede ser un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico.

Las expresiones "aminoácido" y "residuo de aminoácido" pueden usarse indistintamente en el presente documento y no deben entenderse como limitantes. Los aminoácidos son compuestos orgánicos que contienen grupos funcionales amina ($-NH_2$) y carboxilo ($-COOH$), junto con una cadena lateral (grupo R) específica de cada aminoácido. En el contexto de la presente invención, los aminoácidos pueden clasificarse de acuerdo con su estructura y características químicas. Por lo tanto, las clases de aminoácidos pueden reflejarse en una o ambas de las siguientes tablas:

Tabla 1 - Clasificación principal basada en la estructura y caracterización química general del grupo R

Clase	Aminoácidos
Residuos ácidos	D y E
Residuos básicos	K, R y H
Residuos hidrofílicos sin carga	S, T, N y Q
Residuos alifáticos sin carga	G, A, V, L e I
Residuos no polares sin carga	C, M y P
Residuos aromáticos	F, Y y W

Tabla 2 - Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de residuos de aminoácidos

Clase	Aminoácidos
Residuos que contienen grupos hidroxilo	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y
Residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Residuos con carga negativa	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Residuos con carga positiva	H, K y R
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Residuos muy pequeños	A, G y S
Residuos involucrados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

La sustitución de un aminoácido por otro puede clasificarse como sustitución conservadora o no conservadora. En el contexto de la invención, una "sustitución conservadora" es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene características estructurales y/o químicas similares, dicha sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido de la misma clase de la forma definida en cualquiera de las dos tablas anteriores: por ejemplo, una sustitución conservadora puede ser la sustitución de leucina por isoleucina, ya que ambas son hidrófobas alifáticas ramificadas. De manera similar, un ejemplo de sustitución conservadora es la sustitución del ácido aspártico por ácido glutámico, ya que ambos son residuos pequeños con carga negativa.

En el contexto de la presente invención, una sustitución en un anticuerpo se indica como: Aminoácido original – número de posición – aminoácido sustituido;

En referencia a la nomenclatura bien reconocida de los aminoácidos, se utiliza el código de tres letras o el código de una letra, incluidos los códigos "Xaa" o "X" para indicar cualquier residuo de aminoácido. Por lo tanto, Xaa o X normalmente pueden representar cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural. La expresión "de origen natural", tal como se utiliza en

el presente documento, se refiere a uno cualquiera de los siguientes residuos de aminoácidos; glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, prolina, triptófano, fenilalanina, tirosina, metionina y cisteína.

En consecuencia, la nomenclatura "K409R" o "Lys409Arg" significa que el anticuerpo comprende una sustitución de lisina por arginina en la posición del aminoácido 409. La sustitución de un aminoácido en una posición determinada por cualquier otro aminoácido se denomina: Aminoácido original – posición; o por ejemplo, "K409". Para una modificación en la que los aminoácidos originales y/o los aminoácidos sustituidos pueden comprender más de uno, pero no todos los aminoácidos, más de un aminoácido puede estar separado por una coma (",") o por una barra ("/"). Por ejemplo, la sustitución de lisina por arginina, alanina o fenilalanina en la posición 409 es: "Lys409Arg,Ala,Phe" o "Lys409Arg/Ala/Phe" o "K409R,A,F" o "K409R/A/F" o "K409 a R, A o F". Dicha designación puede usarse indistintamente en el contexto de la invención pero tiene el mismo significado y propósito.

Además, la expresión "una sustitución" abarca una sustitución en uno u otros diecinueve aminoácidos naturales, o en otros aminoácidos, tales como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido K en la posición 409 incluye cada una de las siguientes sustituciones: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P y 409Y. Estas sustituciones también pueden denominarse K409A, K409C, etc. o K409A,C, etc. o K409A/C/etc. Lo mismo se aplica por analogía a todas y cada una de las posiciones mencionadas en el presente documento, para incluir específicamente en el presente documento una cualquiera de dichas sustituciones.

La expresión "célula hospedante", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico tal como un vector de expresión. Debe entenderse que dichas expresiones pretenden referirse no sólo a la célula de un sujeto en particular, sino que también pueden incluir a la progenie de una célula como esa. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido ya sea a una mutación o bien a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, sino que aún se encuentra incluida dentro del alcance de la expresión "célula hospedante", tal como se usa en el presente documento. Las células hospedantes recombinantes (es decir, las células hospedantes utilizadas para la producción de proteínas recombinantes) incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK-293, células Expi293F, células PER.C6, células NS0 y células linfocíticas, y células procariotas como *E. coli* y otros hospedantes eucariotas tales como células vegetales y hongos.

El término "transfectoma", tal como se usa en el presente documento, incluye células hospedantes eucariotas recombinantes que expresan el anticuerpo o un antígeno diana, tales como células CHO, células PER.C6, células NS0, células HEK293, células Expi293F, células

vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

A los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina a lo largo de la secuencia de referencia utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, "J. Mol. Biol." 48: 443-453), tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), de preferencia la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son una penalidad de abertura de espacio de 10, una penalidad de extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de la "identidad más prolongada" etiquetada de Needle (que se obtiene usando la opción "-nobrief") es empleada como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{cantidad total de espacios en el alineamiento}).$$

También puede medirse la retención de residuos similares, o como alternativa, mediante una puntuación de similitud, determinada a través del uso del programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI usando configuraciones estándar BLOSUM62, espacio abierto=11 y espacio extendido=1). Las variantes adecuadas suelen presentar al menos alrededor de un 45 %, por ejemplo, al menos alrededor de un 55 %, al menos alrededor de un 65 %, al menos alrededor de un 75 %, al menos alrededor de un 85 %, al menos alrededor de un 90 %, al menos alrededor de un 95 % o más (por ejemplo, alrededor de un 99 %) de similitud con la secuencia original o de referencia.

Tabla 3 - Secuencias de aminoácidos

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
1	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR1	GGSFSAYY
2	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR2	INHGGGT
3	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR3	ASLTAY
4	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR1	QGISSW
5	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR2	AAS
6	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR3	QQYDSYPIT

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
7	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR1	GFTFNTYA
8	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR2	IRSKYNNYAT
9	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR3	VRXGNFGNSYVSWFAY, en donde X es H o G
10	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR1	TGAVTTSNY
11	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR2	GTN
12	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR3	ALWYSNLWV
13	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGS�TVSS
14	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL	DIQMTQSPTSLASVGDRVITTCRASQGISSWLTWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQYDSYPITFGQGTRLEIK
15	IgG1-huCD3-FEAL	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRXGNFGNSYVSWFAYW GQGTLLTVSS, en donde X es H o G
16	IgG1-huCD3-FEAL	VL	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
17	IgG1-CD30-MDX060-FERR	Cadena pesada completa	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGS�TVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEFERGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			HNHYTQKSLSLSPG
18	IgG1-CD30-MDX060-FERR	Cadena ligera completa	DIQMTQSPTSLASVGDRTITCRASQGISSWLTWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYDSYPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
19	IgG1-huCD3-FEAL	Cadena pesada completa	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20	IgG1-huCD3-FEAL	Cadena ligera completa	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGLKTLVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
21	IgG1-CD30-hAC10-FAIR	Cadena pesada completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYITWVR QAPGQGLEWMGWIPGSGNTKYNEKFKGRVTMTDRDTSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCANYGNYWFAYWGQGTSLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHHTCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
22	IgG1-CD30-hAC10-FEAR	Cadena ligera completa	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDFDGD SYMN WYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	IgG1-CD30-HRS-3-FEAR	Cadena pesada completa	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTIHWVR QRPGHDLIEWIGYINPSSGYSDYNQNFKGKTTLTADKSS NTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRADYGNYEYTWFAWYG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	IgG1-CD30-HRS-3-FEAR	Cadena ligera completa	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVTVTCKASQNVGTNVAWFQ QKPGQSPKVLIIYSASYRSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEYFCQYHTYPLTFGGGTKLEINRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25	IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR	Cadena pesada completa	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMNWVR QPPGKALEWLGFI RNKANGYTTEFSASVMGRFTISRDDS QSILYQLQMNTLRAEDSATYYCARDPPYGNPHYAMDYW GGGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR	Cadena ligera completa	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSASGYNYMHW YQQKAGQPPKLLIHLASNLESGVPARFSGSGGTDFTLNI HPVEEEDASTYYCQHSSELPTFGSGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	IgG1-CD30-T405-FEAR	Cadena pesada completa	QVQLQQIGAELVRPGASVKLSCKASGYTFNNYWINVVK QRPQGQGLEWIGNIYPSDSRSNYNQKFKDKATLTVDKPS STAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLGSYWGQGLTVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
28	IgG1-CD30-T405-FEAR	Cadena ligera completa	DVVMQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCWQGAHFPRTFGGGTLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	IgG1-CD30-T105-FEAR	Cadena pesada completa	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWI RQPSGKDLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSS NQVFLKITSVDTADTATYYCARRADGLYFDLVWGAGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSC

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-CD30-T105-FEAR	Cadena ligera completa	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNTNVAWYQ QKPGQSPEALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISN VQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	IgG1-CD30-T408-FEAR	Cadena pesada completa	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINVVK QRPGQGLEWIGNIYPSDSYSNYNQKFKDKATLTVDKSS STAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLGSYWGQGTLLTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSQSVVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
32	IgG1-CD30-T408-FEAR	Cadena ligera completa	DVVMQTPTLTSLVITIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCWQGAHFPRTFGGGTLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	IgG1-CD30-T215-FEAR	Cadena pesada completa	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLVSGMGVSWI RQPSGKGLEWLAHIHWDDRRSNPSLRSLTISKDTSN NQVFLKITSVDTADTATYYCARRPDLYGNYFFDFWQGQ TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNV

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	IgG1-CD30-T215-FEAR	Cadena ligera completa	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVFTNVAWYQ QKLGQSPKPLIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISD VQSEDLAEYFCQQYNSYPVTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	IgG1-huCD3H101G-FEAL	Cadena pesada completa	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVSWFAYW GQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	IgG1-b12-FEAL	Cadena pesada completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSA NTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYM DVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	IgG1-b12-FEAL	Cadena ligera completa	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQH KPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITR VEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	IgG1-b12-FERR	Cadena pesada completa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWVR QAPGQRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSA NTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYM DVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHHTCPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	CD30 humano		FPQDRPFEDTCHGNPSHYDDKAVRRCCYRCPMGLFPTQ QCPQRPTDCRKQCEPDYYLDEADRCTACVTCSRDDLVE KTPCAWNSSRVCECRPGMFCSTSAVNSCARCFHFSVCP AGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSS GTIPQAKPTPVSPATSSASTMPVRGGTRLAQEAASKLTR APDSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPEGSGDCRKQCEPDY YLDEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRTCECRPG MICATSATNSCARCVYPICAAETVTKPQDMAEKDTTFE APPLGTQPCDNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTL PIPTSAPVALSSTGKPVLDA GPVLFVWVILVVLVVVGSSAF LLCHRRACRKRIRQKLHLCPVQTSQPKLELVDSPRRS STQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLES LPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKA DTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPE QETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
40	CD30 de mono cynomolgus		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDDKAVRRCCYRCPTGTAQKN TVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPAT SNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTRAPGSPSSVGRPSSDP GLSPTQPCPQSGDCRKQCEPDYYLDEAGRCTACVSCS RDDLVEKTPCAWNSSRICECRPGMICATSATNSCARCV YPICAAETGTPQDMAEKDTTFEAPPVGTQPCDSPTPEN GEAPASTSPTLSSLVDSQASKTLPIPTSAPIALSSTGKPVL DAGPVLFVWVILVLAVVVGSSSTFLLCHRRACRKRIRQKLHL

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			CYPVQTSRPKLELVDSRPRRSSTQFESGTFVTKPSAEELG LMSLPPKETCRNVGAACPESLPLWDASPAGGPSSPRDLP EPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGQGLA GPAEPELEEELEADHAPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEE EGKEDPLPTAASGK
41	CD30 de mono rhesus		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDDKAVRRCCYRCPMGLFPTQ QCPQRPADCRKQCEPDYYLDEAGRCTACVSCSRDDLVE KMPCAWNSSRVCECQPGMFCVSVVNSCARCFFHSVCP AGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSS GTIPQAKPTPVSPATSNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTR APGSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPQGSQDCRQCEPDY YLDEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRICECRPG MICATSATNSCARCVPYPICAAETGTPQDMAEKDTTFE APPVGTQPDCSPTPENGEAPASTSPTLSSLVDSQASKTLP IPTSAPIALSSTGKPVLDAGPVLFVWVILVLAVVVGSSSTFLL CHRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSRPKLELVDSRPRRSST QFESGTFVTKPSAEELGLMSLPPKETCRNVGAACPESLPL WDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADT VIVGTVKAELPEGQGLAGPAEPELEEELEADHAPHYPEQE TEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
42	CD3 humano (épsilon)		QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQ HNDKNIGGDEDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYYVCY PRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDI CITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQN KERPPVPNPDYEPKIRKGQRDLYSGLNQRRRI
43	CD3 de mono cynomolgus		QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCQHLGSEAQW QHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPE DASHHLYLKARVCENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLL LVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVP NPDYEPKIRKGQDLYSGLNQRRRI
44	Región constante de IgG		ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
45	Región constante de IgG	Con sustitución FER (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE R GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
46	Región constante de IgG	Con sustitución FEA (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV A VSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
47	Región constante de IgG	Con sustitución F405L (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSF L LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
48	Región constante de IgG	Con sustitución K409R (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYS RL TVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
49	Región constante de IgG	Con sustitución FER y con sustitución F405L (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE R GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSF L LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
50	Región constante de IgG	Con sustitución FER y con sustitución K409R (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE R GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYS RL TVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
51	Región constante de IgG	Con sustitución FEA y con sustitución F405L (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSF L LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
52	Región constante de IgG	Con sustitución FEA y con sustitución K409R (en negrita)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

SEQ ID N.º	Referencia	Dominio	Secuencia
			REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
53	Región constante	Región constante de cadena ligera kappa humana	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	Región constante	Región constante de cadena ligera lambda humana	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
55	IgG1-CD30-MDX060-FEAR	Cadena pesada completa	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGSLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

Otros aspectos y formas de realización de la invención

Tal como se describió más arriba, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende:

- (i) una región de unión a CD30 que comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 1, 2 y 3, respectivamente, y una primera región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 4, 5 y 6, respectivamente, y
- (ii) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 7, 8 y 9,

respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente.

En una forma de realización, la X en SEQ ID N.º 9 es una H. En otra forma de realización, la X en SEQ ID N.º 9 es una G.

En una forma de realización, la primera región variable de cadena pesada es humana o humanizada. En otra forma de realización, la primera región variable de cadena ligera es humana o humanizada. En una forma de realización, la segunda región variable de cadena pesada es humana o humanizada. En otra forma de realización, la segunda región variable de cadena ligera es humana o humanizada. En otra forma de realización, la primera región variable de cadena pesada y la primera región variable de cadena ligera son humanas. En otra forma de realización, la primera región variable de cadena pesada y la primera región variable de cadena ligera son humanizadas. En otra forma de realización, la segunda región variable de cadena pesada y la segunda región variable de cadena ligera son humanas. En otra forma de realización, la segunda región variable de cadena pesada y la segunda región variable de cadena ligera están humanizadas. En otra forma de realización, la primera región variable de cadena pesada y la primera región variable de cadena ligera son humanas y la segunda región variable de cadena pesada y la segunda región variable de cadena ligera son humanas. En otra forma de realización, la primera región variable de cadena pesada y la primera región variable de cadena ligera son humanas y la segunda región variable de cadena pesada y la segunda región variable de cadena ligera están humanizadas.

Tal como conocen bien los expertos en la técnica, cada región de unión a antígeno de un anticuerpo comprende, en general, una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), y cada una de las regiones variables comprende tres secuencias de CDR. CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, y pueden comprender cuatro secuencias estructurales, FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente. Esta estructura se encuentra de preferencia también en los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una forma de realización, una, dos, tres o la totalidad de dichas cuatro secuencias estructurales son secuencias estructurales humanas.

Tal como se describió más arriba, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD30 humano, cuya secuencia se establece en SEQ ID N.º 39. En particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo en el que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a CD30 humano es capaz de unirse al dominio extracelular de CD30 humano, tal como una molécula de CD30 expresada en una célula, de mayor preferencia una célula tumoral.

Tal como se describe, el anticuerpo comprende una región de unión a CD30 que comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 1, 2 y 3, respectivamente, y una primera región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 4, 5 y 6, respectivamente.

Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 se pueden identificar a partir de regiones variables de cadena pesada y ligera usando métodos conocidos en la técnica. Las regiones CDR de dichas regiones variables de cadena pesada y ligera se han anotado de acuerdo con IMGT (referirse a Lefranc, M.P., "The Immunologist", 7, 132-136 (1999); Lefranc, "Developmental and Comparative Immunology", 27(1), 55-77 (2003)).

En una forma de realización, la región de unión a antígeno que se une a CD30 comprende:

- una (primera) región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia SEQ ID N.º 13, o una secuencia que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N.º 13; y,
- una (primera) región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia SEQ ID N.º 14 o una secuencia que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N.º 14.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la región de unión al antígeno que se une a CD30 como se define en el presente documento, en donde las secuencias comprenden, en total, como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, en comparación con SEQ ID N.º 13.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera (VL) de la región de unión al antígeno que se une a CD30 como se define en el presente documento, en donde las secuencias comprenden, en total, como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, en comparación con SEQ ID N.º 14.

En una forma de realización adicional, la primera región variable de cadena pesada comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 13 y la primera región variable de cadena ligera comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 14.

Dichas regiones de unión a antígenos que son capaces de unirse a CD30 humano se han descrito, entre otros, en el documento WO03059282 (Medarex), que se incorpora al presente documento a modo de referencia.

Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención puede unirse con una constante de disociación de equilibrio KD entre la región de unión al antígeno que se une al CD30 humano y el CD30 humano se encuentra dentro del intervalo de 0,1 a 20 nM, por ejemplo dentro del intervalo de 0,5-5 nM, tal como dentro del intervalo de 1,5-2 nM (unión monovalente). Dicha afinidad de unión se puede determinar mediante interferometría de biocapa.

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención también puede unirse al CD30 de mono cynomolgus (SEQ ID N.º 40).

Tal como se describió más arriba, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la

invención comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3 humano. Además, la invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención capaz de unirse a CD3ε humano (épsilon), tal como CD3ε humano (épsilon) tal como se especifica en SEQ ID N.º 22. Dicha región de unión a antígeno es capaz de unirse a CD3ε humano (épsilon), tal como se presenta en un linfocito T, tal como un linfocito T humano primario.

Tal como se describe, el anticuerpo comprende una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 7, 8 y 9, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente.

En una forma de realización, la región de unión a antígeno que se une a CD3 comprende:

- una (segunda) región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de SEQ ID N.º 15, o una secuencia que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N.º 15; y,
- una (segunda) región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia SEQ ID N.º 16 o una secuencia que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N.º 16.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) de la región de unión al antígeno que se une a CD3 tal como se define en el presente documento, en donde las secuencias comprenden, en total, como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, en comparación con SEQ ID N.º 15.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera (VL) de la región de unión al antígeno que se une a CD3 tal como se define en el presente documento, en donde las secuencias comprenden, en total, como máximo 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, en comparación con SEQ ID N.º 16.

En una forma de realización adicional, la segunda región variable de cadena pesada comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 15 y la segunda región variable de cadena ligera comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 16. En una forma de realización, la X en SEQ ID N.º 15 es una H. En otra forma de realización, la X en SEQ ID N.º 15 es una G.

Dichas regiones de unión a antígenos que son capaces de unirse a CD3 humano se han descrito, entre otros, en el documento WO2015/001085 (Genmab), que se incorpora al presente documento a modo de referencia. Las variantes del mismo, tales como las variantes que comprenden una región VH CDR3 como se establece en SEQ ID N.º 9 en donde X es G, que tiene una menor afinidad por la unión a CD3 humano que el anticuerpo parental en el

que X es H, se han descrito en el Ejemplo 2 del documento WO2017/009442 (Genmab), que se incorpora al presente documento a modo de referencia.

Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención puede unirse con una constante de disociación de equilibrio KD entre la región de unión al antígeno que se une al CD3 humano y el CD3 humano se encuentra dentro del intervalo de 5 a 30 nM, tal como entre 10 y 20 nM (para unión monovalente).

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención también puede unirse a CD3 de mono cynomolgus (SEQ ID N.º 43).

En una forma de realización adicional, el anticuerpo multiespecífico comprende:

- (i) una región de unión a CD30 que comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 13 y una primera región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 14, y
- (ii) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 15 y una segunda región variable de cadena ligera que comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 16.

Formatos del anticuerpo

El anticuerpo multiespecífico de la invención puede tener dos o más especificidades, tales como dos o tres o más especificidades. Además, el anticuerpo multiespecífico puede tener más de una copia de la región de unión al antígeno para CD3 y/o CD30. Por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo tiene dos regiones de unión a antígeno capaces de unirse a CD3, tales como dos regiones de unión idénticas que se unen a CD3. Por ejemplo, en otra forma de realización, el anticuerpo tiene dos regiones de unión a antígeno que se unen a CD30, tales como dos regiones de unión idénticas que se unen a CD30. Una región de unión a antígeno adicional, por ejemplo, puede estar presente en forma de un scFv unido covalentemente a la región constante.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo multiespecífico de la invención es un anticuerpo biespecífico. En la técnica se conocen muchos formatos y usos diferentes de anticuerpos biespecíficos y fueron revisados por Kontermann; "Drug Discov Today", julio de 2015; 20(7):838-47 y; MAb, marzo-abril de 2012; 4(2):182-97 y por Labrijn *et al.*, "2019 Nat Rev Drug Discov", 18(8) 585-608. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención no puede limitarse a ningún formato o método biespecífico particular para producirlo.

Ejemplos de moléculas de anticuerpo biespecífico que pueden usarse en la presente invención comprenden (i) un único anticuerpo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión a antígeno; (ii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para dos dianas diferentes, por ejemplo, a través de dos scFv unidos en tándem mediante un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a

través de un enlace peptídico corto (Wu *et al.*, "Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg" (2010)); (iv) un fragmento biespecífico (Fab')₂ unido químicamente; (v) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vi) un flexicuerpo, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (vii) una molécula denominada "dock and lock", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" de la proteína quinasa A, que, cuando se aplica a Fabs, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consta de dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (viii) una denominada molécula de Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.

Otros ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, entre otros, (i) moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas de doble direccionamiento recombinantes similares a IgG, en las que los dos lados de la molécula contienen cada uno el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; (iii) moléculas de fusión de IgG, en las que los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan con un fragmento Fab adicional o partes de un fragmento Fab; (iv) moléculas de fusión Fc, en las que moléculas Fv de cadena sencilla o diacuerpos estabilizados están fusionados a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas; (v) moléculas de fusión Fab, en las que diferentes fragmentos Fab están fusionados entre sí, fusionados a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas; y (vi) anticuerpos de cadena pesada y basados en scFv y diacuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio, nanocuerpos) en los que diferentes moléculas de Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (por ejemplo, anticuerpos de dominio, nanocuerpos) están fusionados entre sí o a otra proteína o molécula portadora fusionada a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas.

Los ejemplos de moléculas similares a IgG con moléculas de dominio CH3 complementarias incluyen, entre otras, las moléculas Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO2011069104), las denominadas moléculas "Knobs-into-Holes" (botón en ojal) (Genentech, WO9850431), CrossMAbs (Roche, WO2011117329) y las moléculas electrostáticamente emparejadas (Amgen, EP1870459 y WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), las moléculas LUZ-Y (Genentech, Wranik *et al.*, "J. Biol. Chem." 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub, del 1.º de noviembre de 2012), moléculas de cuerpo DIG y cuerpo de PIG (Pharmabci, WO2010134666, WO2014081202), las moléculas del cuerpo de dominio de ingeniería de intercambio de hebras (SEEDbody) (EMD Serono, WO2007110205), las moléculas Biclonics (Merus, WO2013157953), las moléculas FcΔAdp (Regeneron, WO201015792), las moléculas

biespecíficas IgG1 e IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), las moléculas de armazón Azymetric (Zymeworks/Merck, WO2012058 768), moléculas mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), anticuerpos biespecíficos bivalentes (WO2009080254) y las moléculas DuoBody® (Genmab A/S, WO2011131746).

Ejemplos de moléculas de diana doble recombinantes similares a IgG incluyen, entre otras, moléculas de Ig de diana doble (DT) (WO2009058383), anticuerpo dos en uno (Genentech; Bostrom, *et al.*, 2009. Science 323, 1610–1614), Mabs reticulados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO2008003116), moléculas Zybody (Zyngenia; LaFleur *et al.* Mabs, de marzo-abril de 2013; 5(2):208-18), enfoques con cadena ligera común (Crucell/Merus, US7.262.028), moléculas kappa/lambda body™ (NovImmune, WO2012023053) y CovX-body (CovX/Pfizer; Doppalapudi, V.R., *et al.* 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501–506).

Ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, entre otras, moléculas de Ig de dominio variable dual (DVD) (Abbott, US7.612.181), anticuerpos de doble cabeza de dominio dual (Unilever; Sanofi Aventis, documento WO20100226923), moléculas biespecíficas similares a IgG (ImClone/ Eli Lilly, Lewis *et al.* "Nat Biotechnol." de febrero de 2014; 32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ; Dimasi *et al.*, "J Mol Biol." del 30 de octubre de 2009; 393(3):672-92) y moléculas BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), moléculas HERCULES (Biogen Idec, US007951918), moléculas de fusión scFv (Novartis), moléculas de fusión scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) y moléculas TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530).

Ejemplos de moléculas de fusión Fc incluyen, entre otros, fusiones scFv/Fc (Pearce *et al.*, "Biochem Mol Biol Int." , de septiembre de 1997; 42(6):1179-88), moléculas SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, *et al.*, AACR 100.º Asamblea anual de 2009 (Resumen N.º 5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), moléculas de tecnología de reorientación de doble afinidad (DART basada en Fc) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538) y moléculas Dual(scFv)2-Fab (Centro Nacional de Investigación en Medicina de Anticuerpos – China).

Ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión Fab incluyen, entre otros, moléculas F(ab)2 (Medarex/AMGEN; Deo *et al.*, "J Immunol." del 15 de febrero de 1998; 160(4):1677-86.), Bis-Moléculas Fab o de doble acción (Genentech, Bostrom, *et al.* 2009. Science 323, 1610–1614), Moléculas Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics, WO2003074569, WO2005004809), Moléculas bivalentes biespecíficas (Biotechnol, Schoonjans, J Immunol., del 15 de diciembre de 2000; 165(12):7050-7) y moléculas Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009040562 A1).

Ejemplos de anticuerpos scFv, basados en diacuerpos y de dominio incluyen, entre otros, moléculas biespecíficas de activación de linfocitos T (BiTE) (Micromet, WO2005061547), moléculas de diacuerpos en tándem (TandAb) (Affimed) Le Gall *et al.*, "Protein Eng Des Sel." de abril de 2004; 17(4):357-66.), Moléculas DART (MacroGenics,

WO2008157379, WO2010080538), Moléculas Diacuerpo monocatenarias (Lawrence, FEBS Lett., del 3 de abril de 1998; 425(3):479-84), anticuerpos tipo TCR (AIT, ReceptorLogics), fusión de scFv de albúmina sérica humana (Merrimack, WO2010059315) y moléculas COMBODY (Epigen Biotech, Zhu *et al.*, "Immunol Cell Biol.", de agosto de 2010; 88(6):667-75.), nanocuerpos de doble diana (Ablynx, Hmila *et al.*, FASEB J. 2010) y anticuerpos de dominio único de cadena pesada de doble diana.

En una forma de realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un cuerpo cruzado o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio controlado de brazos Fab (tal como se describe en el documento WO2011131746 (Genmab)).

En una forma de realización, el anticuerpo de la presente invención es una molécula DuoBody® biespecífica (Genmab A/S, WO2011131746).

El anticuerpo multiespecífico, tal como biespecífico, de la invención puede ser de cualquier isotipo. Los isotipos ilustrativos incluyen, entre otros, cualquiera de los isotipos humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. De preferencia, los anticuerpos pueden seleccionarse para que sean del isotipo IgG1 humano, tal como se muestra en los ejemplos. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda, o ambas, por ejemplo, las secuencias establecidas en SEQ ID N.º 53 y 54. Por ejemplo, en una forma de realización, la cadena ligera involucrada en la unión de CD30 comprende una región constante kappa y la cadena ligera involucrada en la unión de CD3 comprende una región constante lambda. En una forma de realización, ambas cadenas pesadas de un anticuerpo de la presente invención son del isotipo IgG1. En una forma de realización, las dos cadenas pesadas de un anticuerpo biespecífico son de los isotipos IgG1 e IgG4, respectivamente. De preferencia, los anticuerpos biespecíficos pueden seleccionarse para que sean del isotipo IgG1 humano, tal como se muestra en los ejemplos. De forma opcional y preferida, las secuencias de la cadena pesada y de la región Fc de la misma del isotipo seleccionado pueden modificarse, de preferencia, en la región bisagra, CH2 y/o CH3, para permitir la generación de anticuerpos biespecíficos y/o introducir inercia.

En una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico de la invención comprende una región Fc que consiste de un primer y un segundo polipéptido Fc.

En una forma de realización, el primer polipéptido Fc y la primera región variable de la cadena pesada están comprendidos dentro de la misma cadena polipeptídica y en donde el segundo polipéptido Fc y la segunda región variable de la cadena pesada están comprendidos dentro de la misma cadena polipeptídica.

El primer y segundo polipéptidos Fc pueden ser cada uno de cualquier isotipo, incluyendo cualquier isotipo humano, tal como un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM o IgA o un isotipo mixto. De preferencia, la región Fc es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humano o un isotipo mixto. En una forma de realización, dicha región Fc es una región Fc de IgG1 humana.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo

de longitud completa tal como se define en el presente documento.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden comprender modificaciones en la región Fc para convertir el anticuerpo en un anticuerpo inerte o no activador. Por lo tanto, en los anticuerpos descritos en el presente documento, una o ambas cadenas pesadas pueden modificarse de modo que el anticuerpo induzca la función efectora mediada por Fc en menor medida en relación con un anticuerpo que es idéntico, excepto que no comprende dichas modificaciones. La función efectora mediada por Fc se puede medir determinando la expresión de CD69 mediada por Fc en linfocitos T (es decir, la expresión de CD69 como resultado del entrecruzamiento de CD3 dependiente del receptor de Fcγ mediado por anticuerpos CD3, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO2015001085), mediante la unión a receptores de Fcγ, mediante unión a C1q o mediante inducción de entrecruzamiento de FcγR mediado por Fc. En particular, las secuencias constantes de la cadena pesada pueden modificarse de modo que la expresión de CD69 mediada por Fc se reduzca en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % o 100 % en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje (no modificado), en el que dicha expresión de CD69 mediada por Fc se determina en un ensayo funcional basado en PBMC, por ejemplo, mediante citometría de flujo tal como se describe en el Ejemplo 3 del documento WO2015001085. Las modificaciones de las secuencias constantes de las cadenas pesada y ligera también pueden dar como resultado una unión reducida de C1q a dicho anticuerpo. En comparación con un anticuerpo no modificado, la reducción puede ser de al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % o un 100 % y la unión de C1q se puede determinar mediante ELISA. Además, la región Fc que puede modificarse de modo que dicho anticuerpo medie una proliferación de linfocitos T mediada por Fc reducida en comparación con un anticuerpo no modificado en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % o un 100 %, por ejemplo, en una parte lineal de la curva, en la que dicha proliferación de linfocitos T se mide en un ensayo funcional basado en PBMC.

Se ha desarrollado una amplia gama de diferentes formatos de anticuerpos no activadores en los que se han introducido sustituciones de aminoácidos y combinaciones de las mismas en la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo de isotipo IgG1 para eliminar funciones efectoras mediadas por Fc (por ejemplo, Chiu *et al.*, "Antibodies", de diciembre de 2019; 8(4):55; Liu *et al.*, "Antibodies", del 17 de noviembre de 2020; 9(4):64; 29(10):457-66; Shields *et al.*, "J Biol Chem.", del 2 de marzo de 2001; 276(9):6591-604).

Ejemplos de posiciones de aminoácidos que pueden modificarse, por ejemplo, en un anticuerpo de isotipo IgG1, incluyen las posiciones L234 y L235. En una forma de realización, el primer y/o segundo polipéptido Fc comprende(n) una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en las posiciones L234 y/o L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, en donde las sustituciones son, de preferencia, por F y E, respectivamente, en

donde las posiciones de los aminoácidos son como se definen mediante la numeración Eu.

Se entiende que además de las modificaciones de las posiciones de los aminoácidos L234 y L235, se pueden modificar otras posiciones. De esta manera, en una forma de realización adicional, el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y el primer y/o segundo polipéptido Fc comprenden, además, una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición G236 en una cadena pesada de IgG1 humana, en el que la sustitución es, de preferencia, por R.

En otra forma de realización, el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden, además, una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición G236 en una cadena pesada de IgG1 humana, en donde la sustitución es, de preferencia, por R.

En otra forma de realización, el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y el primer y/o segundo polipéptido Fc comprenden, además, una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, en donde la sustitución es, de preferencia, por A.

En otra forma de realización, el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden, además, una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, en donde la sustitución es, de preferencia, por A.

En otra forma de realización, uno del primer y segundo polipéptidos Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y G236 por F, E y R, respectivamente, y el otro polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235E y D265 por F, E y A, respectivamente.

En una forma de realización adicional, el primer polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y G236 por F, E y R, respectivamente, y el segundo polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235E y D265 por F, E y A, respectivamente, en donde las posiciones de los aminoácidos son como se definen mediante la numeración Eu.

Por ejemplo, se proporcionan, entre otros, regiones constantes que tienen tales sustituciones de regiones Fc. en SEQ ID N.º 45, 46, 49, 50, 51 y 52, que pueden compararse con SEQ ID N.º 44, que no tiene dichas sustituciones. En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID N.º 45, 46, 49, 50, 51 y 52.

En una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico o biespecífico de la invención comprende una región Fc que comprende primera y segunda regiones CH3 que son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dicha primera y segundas regiones CH3. Se proporcionan más detalles sobre estas interacciones y cómo se pueden lograr en los documentos WO2011131746 y WO2013060867 (Genmab), que se incorporan al presente documento a modo de referencia. Se pueden obtener anticuerpos heterodiméricos estables con un alto rendimiento, por ejemplo mediante el llamado intercambio de brazo Fab como se proporciona en los documentos WO 2008/119353 y WO 2011/131746, sobre la base de dos anticuerpos de partida homodiméricos que contienen solo unas pocas mutaciones asimétricas en las regiones CH3.

En formas de realización particulares, la invención proporciona un anticuerpo, en el que el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en dicho primer polipéptido Fc, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en dicho segundo polipéptido Fc, o viceversa.

En una forma de realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 es R en el primer polipéptido Fc y en donde el aminoácido en la posición correspondiente a F405 es L en el segundo polipéptido Fc.

Por lo tanto, en una forma de realización, en el primer polipéptido Fc, al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en: T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana han sido sustituidos, y en el segundo polipéptido Fc al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en: T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana han sido sustituidos, y en donde dichas sustituciones en el primer y segundo polipéptidos Fc no están en las mismas posiciones, en donde las posiciones de aminoácidos son como se definen en la numeración Eu. Por ejemplo, se proporcionan, entre otros, regiones constantes que tienen tales sustituciones de regiones Fc. en SEQ ID N.º 47, 48, 49, 50, 51 y 52, que pueden compararse con SEQ ID N.º 44, que no cuenta con una sustitución como esta. En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID N.º 47, 48, 49, 50, 51 y 52.

De preferencia, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 es L en el primer polipéptido Fc y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 es R en el segundo polipéptido Fc, o viceversa.

De esta manera, en una forma de realización, uno del primer y segundo polipéptidos Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235, G236 y F405 por F, E, R y L, respectivamente, y el otro polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las

posiciones L234, L235E, D265 y K409 por F, E, A y R, respectivamente.

En otra forma de realización, uno del primer y segundo polipéptidos Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235, G236 y K409 por F, E, R y R, respectivamente, y el otro polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235E, D265 y F405 por F, E, A y L, respectivamente.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende:

(i) una región de unión a CD30 que comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 1, 2 y 3, respectivamente, y una primera región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 4, 5 y 6, respectivamente, y

(ii) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 7, 8 y 9, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente;

en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico y comprende una región Fc que consiste en un primer y un segundo polipéptidos Fc;

en donde el primer polipéptido Fc y la primera región variable de la cadena pesada están comprendidos dentro de la misma cadena polipeptídica y en donde el segundo polipéptido Fc y la segunda región variable de la cadena pesada están comprendidos dentro de la misma cadena polipeptídica;

en donde el primer polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y G236 por F, E y R, respectivamente, y el segundo polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y D265 por F, E y A, respectivamente, en donde las posiciones de los aminoácidos son como se definen mediante la numeración Eu; y

en donde el aminoácido en la posición correspondiente a K409 es R en el primer polipéptido Fc y en donde el aminoácido en la posición correspondiente a F405 es L en el segundo polipéptido Fc.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende:

(i) una región de unión a CD30 que comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 1, 2 y 3, respectivamente, y una primera región variable de cadena ligera que comprende las

secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 4, 5 y 6, respectivamente, y

(ii) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 7, 8 y 9, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente;

en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico y comprende una región Fc que consiste en un primer y un segundo polipéptido Fc;

en donde el primer polipéptido Fc y la primera región variable de la cadena pesada están comprendidos dentro de la misma cadena polipeptídica y en donde el segundo polipéptido Fc y la segunda región variable de la cadena pesada están comprendidos dentro de la misma cadena polipeptídica;

en donde el primer polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y D265 por F, E y A, respectivamente, y el segundo polipéptido Fc comprende sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y D265 por F, E y A, respectivamente, en donde las posiciones de los aminoácidos son las definidas por la numeración Eu; y

en donde el aminoácido en la posición correspondiente a K409 es R en el primer polipéptido Fc y en donde el aminoácido en la posición correspondiente a F405 es L en el segundo polipéptido Fc.

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende o consiste en las secuencias de cadena pesada establecidas en SEQ ID N.º 17 y 19 y las secuencias de cadena ligera establecidas en SEQ ID N.º 18 y 20.

En otra forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende o consiste en las secuencias de cadena pesada establecidas en SEQ ID N.º 17 y 19 y las secuencias de cadena ligera establecidas en SEQ ID N.º 18 y 20, y dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende o consiste en las secuencias de cadena pesada establecidas en SEQ ID N.º 17 y 35 y las secuencias de cadena ligera establecidas en SEQ ID N.º 18 y 20.

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende o consiste en las secuencias de cadena pesada establecidas en SEQ ID N.º 55 y 19 y las secuencias de cadena ligera establecidas en SEQ ID N.º 18 y 20.

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende o consiste en las secuencias de cadena pesada establecidas en SEQ ID N.º 55 y 35 y las secuencias de cadena ligera establecidas en SEQ ID N.º 18 y 20.

En otra forma de realización adicional, el anticuerpo de la invención es bsG1-huCD3-

FEALxCD30-MDX060-FEAR o bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. En aún otra forma de realización, el anticuerpo de la invención es bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR.

Las secuencias de región constante enumeradas en SEQ ID N.º 44 a 52 y 55 no incluyen una lisina de extremo C terminal (K). Sin embargo, en las secuencias naturales encontradas en humanos de las que derivan estas regiones Fc, dicha lisina de extremo C terminal puede estar presente como parte del marco de lectura abierto. Durante la producción en cultivo celular de anticuerpos recombinantes, esta lisina terminal puede ser escindida por proteólisis por una o más carboxipeptidasas endógenas, dando lugar a una región constante que tiene la misma secuencia pero carece de la lisina de extremo C terminal. Para la producción de anticuerpos, puede omitirse el ADN que codifica esta lisina terminal de la secuencia de modo de producir los anticuerpos sin la lisina. La omisión de la lisina de extremo C terminal de la secuencia que codifica el anticuerpo puede aumentar la homogeneidad del anticuerpo con respecto a la presencia de lisina de extremo C terminal. Los anticuerpos producidos a partir de secuencias de ácido nucleico que codifican o no una lisina terminal son sustancialmente idénticos en secuencia y función, ya que el grado de procesamiento de la lisina de extremo C terminal suele ser elevado cuando se utilizan, por ejemplo, anticuerpos producidos en sistemas de producción basados en CHO (Dick, L. W. *et al.*, "Biotechnol. Bioeng.", 2008; 100: 1132-1143). Por lo tanto, se entiende que los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden generarse sin codificar o tener una lisina de extremo C terminal tal como se enumera en el presente documento. De este modo, para los fines de la producción, se pueden generar anticuerpos sin tener una lisina de extremo C terminal.

En formas de realización alternativas, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención no es un anticuerpo clásico de longitud completa que comprende una región Fc. Por ejemplo, en una forma de realización,

- (i) la región de unión a CD30 y/o la región de unión a CD3 es un Fab,
- (ii) la región de unión a CD30 y/o la región de unión a CD3 es un scFv,
- (iii) la región de unión a CD30 es Fab y la región de unión a CD3 es un scFv, o
- (iv) la región de unión a CD30 es un scFv y la región de unión a CD3 es un Fab.

Unión, citotoxicidad y activación de linfocitos T

Los anticuerpos, tales como los anticuerpos biespecíficos, descritos en el presente documento que pueden unirse a CD3 humano y CD30 humano, pueden dirigir ventajosamente los linfocitos T a células cancerosas que expresan CD30 humano, induciendo así la destrucción mediada por linfocitos T de dichas células cancerosas.

Tal como se dijo, de preferencia, el anticuerpo de acuerdo con la invención es inerte y, además, el anticuerpo comprende una o más de las siguientes características:

a) es capaz de unirse a células tumorales humanas que expresan CD30, tales como células SU-DHL-1, células SUP-M2, células DL-40, células KARPAS-299, células L-82, células SR-786, células L-540, células KM-H2, células L-1236, células JVM-2, células HH, células NCEB-1 y/o

células HDLM-2, cuando se las somete a prueba usando citometría de flujo, por ejemplo tal como se describe en los Ejemplos del presente documento,

b) es capaz de mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración de células tumorales humanas que expresan CD30 cuando se utilizan, por ejemplo, PBMC purificadas, células efectoras ADCC o linfocitos T como células efectoras cuando se las somete a prueba de forma descrita en los Ejemplos del presente documento,

c) es capaz de mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración de una o más líneas celulares tumorales que expresan CD30 humano seleccionadas del grupo que consiste en: células SU-DHL-1, células L-428, células KM-H2, células SUP-M2, células KI-JK y células HDLM-2, cuando se usan, por ejemplo, PBMC purificadas o linfocitos T como células efectoras cuando se las somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento,

d) es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T *in vitro* en presencia de células tumorales humanas que expresan CD30; por ejemplo, cuando se las somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento,

e) es capaz de activar linfocitos T *in vitro* en presencia de una o más líneas celulares tumorales humanas que expresan CD30 seleccionadas entre el grupo que consiste en: células SU-DHL-1, células L-428, células KI-JK y células HDLM-2, cuando se las somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento,

f) es capaz de inducir una producción dependiente de la dosis *in vitro* por linfocitos T de citocinas y granzima B, cuando se los somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento,

g) es capaz de no dar como resultado el fratricidio de linfocitos T incluso aunque CD30 se exprese en una subpoblación de linfocitos T activados, cuando se los somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, y/o

h) es capaz de inducir citotoxicidad mediada por linfocitos T incluso en presencia de sCD30, cuando se los somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento.

En una forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento induce citotoxicidad mediada por linfocitos T con una concentración de CE50 por debajo de 0,050 $\mu\text{g/ml}$, como ser por debajo de 0,045 $\mu\text{g/ml}$, como ser por debajo de 0,040 $\mu\text{g/ml}$, como ser por debajo de 0,035 $\mu\text{g/ml}$, como ser por debajo de 0,030 $\mu\text{g/ml}$, como ser por debajo de 0,025 $\mu\text{g/ml}$, como ser por debajo de 0,020 $\mu\text{g/ml}$, cuando se lo somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo.

En otra forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento tiene una lisis máxima cuando induce citotoxicidad mediada por linfocitos T por encima del 80 %, tal como por encima del 85 %, tal como por encima del 90 %, cuando se somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo.

En una forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente

documento induce la activación de linfocitos T CD4⁺ que tienen una concentración de EC₅₀ de expresión de CD25 inferior a 0,05 µg/ml, tal como inferior a 0,045 µg/ml, tal como inferior a 0,04 µg/ml, tal como inferior a 0,035 µg/ml, tal como inferior a 0,03 µg/ml, cuando se somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo. En otra forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento induce la activación de linfocitos T CD8⁺ que tienen una concentración de EC₅₀ de expresión de CD25 por debajo de 0,005 µg/ml, tal como por debajo de 0,001 µg/ml, tal como por debajo de 0,0009 µg/ml, tal como por debajo de 0,0008 µg/ml, tal como por debajo de 0,0007 µg/ml, cuando se somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo.

En una forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento induce la activación de linfocitos T CD4⁺ que tienen una concentración de EC₅₀ de expresión de CD69 por debajo de 0,004 µg/ml, tal como por debajo de 0,003 µg/ml, tal como por debajo de 0,002 µg/ml, tal como por debajo de 0,001 µg/ml, tal como por debajo de 0,0009 µg/ml, cuando se somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo. En otra forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento induce la activación de linfocitos T CD8⁺ que tienen una concentración de EC₅₀ de expresión de CD69 por debajo de 0,0035 µg/ml, tal como por debajo de 0,0030 µg/ml, tal como por debajo de 0,0025 µg/ml, tal como por debajo de 0,0020 µg/ml, tal como por debajo de 0,0015 µg/ml, cuando se somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo.

En una forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento induce la activación de linfocitos T CD4⁺ que tienen una concentración de EC₅₀ de expresión de PD-1 por debajo de 0,01 µg/ml, tal como por debajo de 0,008 µg/ml, tal como por debajo de 0,007 µg/ml, tal como por debajo de 0,006 µg/ml, tal como por debajo de 0,005 µg/ml, cuando se somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo. En otra forma de realización, el anticuerpo tal como se describe en el presente documento induce la activación de linfocitos T CD8⁺ que tienen una concentración de EC₅₀ de expresión de PD-1 por debajo de 0,007 µg/ml, tal como por debajo de 0,006 µg/ml, tal como por debajo de 0,005 µg/ml, tal como por debajo de 0,004 µg/ml, tal como por debajo de 0,003 µg/ml, cuando se somete a prueba de la forma descrita en los Ejemplos del presente documento, tal como usando células tumorales L-428 y midiendo por citometría de flujo.

Los ensayos se pueden llevar a cabo de la forma usualmente realizada por los expertos en la técnica y, en forma opcional, pueden comprender una relación entre células efectoras y células diana (E:T) de 4:1 y/o en forma opcional, un período de incubación de 72 horas. Los ensayos podrían realizarse, por ejemplo, proporcionando células tumorales, de preferencia,

células tumorales marcadas, tales como células tumorales L-428; añadiendo el anticuerpo como se describe en el presente documento, de preferencia, en una dilución en serie; proporcionando linfocitos T, de preferencia, linfocitos T marcados, en una relación entre efector y diana E:T de 4:1 e incubando durante 72 horas; de forma opcional tiñendo parámetros relevantes como CD4, CD8, CD25, CD69 y/o PD-1 y, finalmente, analizando las células mediante citometría de flujo como FACS. El porcentaje de células vivas y/o proliferación/activación de linfocitos T se puede calcular a partir de los datos obtenidos mediante el análisis como es comúnmente conocido por los expertos en la técnica.

Producción de anticuerpos de la invención

Se pueden usar métodos tradicionales tales como el hibridoma híbrido y métodos de conjugación química (Marvin y Zhu (2005) *Acta Pharmacol Sin* 26:649) en la preparación de los anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos de la invención. La coexpresión en una célula hospedante de dos anticuerpos, que consisten en diferentes cadenas pesadas y ligeras, conduce a una mezcla de posibles productos de anticuerpos además del anticuerpo biespecífico deseado, que luego puede aislarse mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad o métodos similares.

Tal como se mencionó, también se pueden usar estrategias que favorezcan la formación de un producto biespecífico funcional después de la coexpresión de diferentes construcciones de anticuerpos, por ejemplo, el método descrito por Lindhofer *et al.* (1995 *J Immunol* 155:219). La fusión de hididomas de rata y ratón que producen diferentes anticuerpos conduce a un número limitado de proteínas heterodiméricas debido al emparejamiento preferencial de cadenas pesadas/ligeras restringidas por especies. Otra estrategia para promover la formación de heterodímeros sobre homodímeros es una estrategia de "botón en ojal" en la que se introduce una protuberancia en un primer polipéptido de cadena pesada y una cavidad correspondiente en un segundo polipéptido de cadena pesada, de modo que la protuberancia pueda ser colocada en la cavidad en la interfase de estas dos cadenas pesadas para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las "protuberancias" se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfase del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes. Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (patente estadounidense N.º 5.731.168). Los documentos EP1870459 (Chugai) y WO2009089004 (Amgen) describen otras estrategias para favorecer la formación de heterodímeros después de la coexpresión de diferentes dominios de anticuerpos en una célula hospedante. En estos métodos, uno o más residuos que forman la interfase CH3-CH3 en ambos dominios CH3 se reemplazan con un aminoácido cargado de modo que la formación de homodímeros sea electrostáticamente desfavorable y la heterodimerización sea electrostáticamente favorable. El documento WO2007110205

(Merck) describe otra estrategia más, en la que se aprovechan las diferencias entre los dominios CH3 de IgA e IgG para promover la heterodimerización.

Otro método *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos se ha descrito en el documento WO2008119353 (Genmab), en donde se forma un anticuerpo biespecífico mediante intercambio de "brazo Fab" o "media molécula" (intercambio de una cadena pesada y una cadena ligera unida) entre dos anticuerpos monoespecíficos IgG4 o similares a IgG4 después de la incubación en condiciones reductoras. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab que pueden comprender secuencias diferentes.

Un método preferido para preparar los anticuerpos CD3xCD30 biespecíficos de la presente invención incluye métodos descritos en los documentos WO2011131746 y WO13060867 (Genmab) que comprenden los siguientes pasos:

- a) proporcionar un primer anticuerpo que comprende una región Fc, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3;
 - b) proporcionar un segundo anticuerpo que comprende una segunda región Fc, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo CD30 y el segundo anticuerpo es un anticuerpo CD3, o viceversa;
- en donde las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3;
- c) incubar dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras; y
 - d) obtener dicho anticuerpo biespecífico CD3xCD30.

De manera similar, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico, de acuerdo con la invención, que comprende:

- a) proporcionar un primer anticuerpo homodimérico que comprende la región de unión a CD30 tal como se describe en el presente documento, y un segundo anticuerpo homodimérico que comprende la región de unión a CD3 tal como se describe en el presente documento, en donde dichos anticuerpos comprenden una región Fc y en forma opcional, contienen características adicionales descritas en el presente documento, en donde las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 del primer y segundo anticuerpos son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre la primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de la primera y segunda regiones CH3;
- b) incubar el primer anticuerpo junto con el segundo anticuerpo en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en las regiones bisagra experimenten una isomerización por enlace disulfuro; y
- c) obtener un anticuerpo multiespecífico heterodimérico de la invención tal como se describe

en el presente documento, que comprende la primera cadena pesada de inmunoglobulina y la primera cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina y la segunda cadena ligera de inmunoglobulina del segundo anticuerpo.

En una forma de realización, dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo se incuban en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten una isomerización por enlace disulfuro, en donde la interacción heterodimérica entre dicho primer y segundo anticuerpos en el anticuerpo heterodimérico resultante es tal que no se produce ningún intercambio de brazo Fab con GSH 0,5 mM después de 24 horas a una temperatura de 37 °C.

Sin limitarse a la teoría, en el paso c), los enlaces disulfuro de cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos originales se reducen y las cisteínas resultantes son capaces entonces de formar enlaces disulfuro entre cadenas pesadas con residuos de cisteína de otra molécula de anticuerpo original (originalmente con una especificidad diferente). En una forma de realización de este método, las condiciones reductoras en el paso c) comprenden la adición de un agente reductor, por ejemplo, un agente reductor seleccionado entre el grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditionerititol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol, de preferencia un agente reductor seleccionado entre el grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditioneitol y tris(2-carboxietil)fosfina. En una forma de realización preferida, el agente reductor es 2-mercaptoetilamina. En otra forma de realización, el paso c) comprende restaurar las condiciones para que se vuelvan no reductoras o menos reductoras, por ejemplo, mediante la eliminación de un agente reductor, como ser mediante desalación.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo monoespecífico que comprende:

- (i) una región de unión a CD30 que comprende una primera región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 1, 2 y 3, respectivamente, y una primera región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 4, 5 y 6, respectivamente, y
- (ii) una región Fc que consiste en un primer y segundo polipéptidos Fc en donde el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y en donde el primero y segundo polipéptidos Fc comprenden, además, una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición G236 en una cadena pesada de IgG1 humana, en donde la sustitución es, de preferencia, por R, en donde las posiciones de los aminoácidos son como se definen mediante la numeración Eu.

En una forma de realización, la primera región variable de cadena pesada comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 13 y la primera región variable de cadena ligera comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 14.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo monoespecífico que comprende:

- (i) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 7, 8 y 9, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente, y
- (ii) una región Fc que consiste en un primer y segundo polipéptidos Fc en donde el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y en donde el primero y segundo polipéptidos Fc comprenden, además, una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición G236 en una cadena pesada de IgG1 humana, en donde la sustitución es, de preferencia, por R, en donde las posiciones de los aminoácidos son como se definen mediante la numeración Eu.

En una forma de realización, X en SEQ ID N.º 9 es una H. En otra forma de realización, X en SEQ ID N.º 9 es una G. En una forma de realización, la segunda región variable de cadena pesada comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 15 y la segunda región variable de cadena ligera comprende la secuencia establecida en SEQ ID N.º 16.

En una forma de realización, los anticuerpos monoespecíficos mencionados más arriba son anticuerpos de longitud completa. De preferencia, al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en: T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana han sido sustituidos, en donde de preferencia, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 es L o el aminoácido en la posición correspondiente a K409 es R.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo multiespecífico, que comprende:

- a) proporcionar un primer anticuerpo CD30 monoespecífico tal como se describió más arriba en el presente documento y un segundo anticuerpo que comprende:
 - (i) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 7, 8 y 9, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente, y

(ii) una región Fc que consiste en un primer y segundo polipéptidos Fc en donde el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición D265 por A en una cadena pesada de IgG1 humana

o

proporcionar un segundo anticuerpo CD3 monoespecífico tal como se describió más arriba en el presente documento y un primer anticuerpo que comprende:

(i) una región de unión a CD30 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 1, 2 y 3, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 4, 5 y 6, respectivamente, y

(ii) una región Fc que consiste en un primer y segundo polipéptidos Fc en donde el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición D265 por A en una cadena pesada de IgG1 humana

en donde las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 del primer y segundo anticuerpo son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre la primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de la primera y segunda regiones CH3; en donde de preferencia, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 es L en la primera región CH3 y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 es R en la segunda región CH3, o viceversa,

- b) incubar el primer anticuerpo junto con el segundo anticuerpo en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en las regiones bisagra experimenten una isomerización por enlace disulfuro; y
- c) obtener el anticuerpo multiespecífico que comprende la primera cadena pesada de inmunoglobulina y la primera cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina y la segunda cadena ligera de inmunoglobulina del segundo anticuerpo.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo multiespecífico tal como se describe en el presente documento, que comprende:

- a) proporcionar un primer anticuerpo CD30 monoespecífico tal como se describió en el presente documento y un segundo anticuerpo que comprende:

(i) una región de unión a CD3 que comprende una segunda región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas

en SEQ ID N.º 7, 8 y 9, respectivamente, y una segunda región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 establecidas en SEQ ID N.º 10, 11 y 12, respectivamente, y

(ii) una región Fc que consiste en un primer y segundo polipéptidos Fc en donde el primer y segundo polipéptidos Fc comprenden sustituciones de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos en las posiciones L234 y L235 por F y E, respectivamente, y una sustitución de un aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición D265 por A en una cadena pesada de IgG1 humana,

en donde las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 del primer y segundo anticuerpos son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre la primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de la primera y segunda regiones CH3; en donde de preferencia, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 es R en la primera región CH3 y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 es L en la segunda región CH3,

- b) incubar el primer anticuerpo junto con el segundo anticuerpo en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en las regiones bisagra experimenten una isomerización por enlace disulfuro; y
- c) obtener el anticuerpo multiespecífico que comprende la primera cadena pesada de inmunoglobulina y la primera cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina y la segunda cadena ligera de inmunoglobulina del segundo anticuerpo.

La presente invención se refiere, además, a un anticuerpo multiespecífico obtenido mediante un método tal como se describe en el presente documento.

En los métodos anteriores, los pasos de proporcionar un primer o segundo anticuerpos homodiméricos capaces de unirse a CD30 y/o CD3, pueden comprender los pasos de:

- proporcionar células que contienen vectores de expresión para producir dicho anticuerpo o dichos anticuerpos; y
- permitir que las células produzcan dicho anticuerpo o dichos anticuerpos y posteriormente,
- obtener dicho anticuerpo o dichos anticuerpos, proporcionando de este modo dicho anticuerpo o dichos anticuerpos.

En una forma de realización de este método, dichos primer y/o segundo anticuerpos homodiméricos son anticuerpos de longitud completa.

Las regiones Fc del primer y segundo anticuerpos homodiméricos pueden ser de cualquier isotipo, incluidos, entre otros, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una forma de realización de este método, las regiones Fc de dicho primer y segundo anticuerpos homodiméricos son del isotipo IgG1. En otra forma de realización, una de las regiones Fc de dichos anticuerpos homodiméricos es del isotipo IgG1 y la otra, del isotipo IgG4. En la última forma de

realización, el anticuerpo biespecífico resultante comprende una región Fc de una IgG1 y una región Fc de IgG4 y, por lo tanto, puede tener propiedades intermedias interesantes con respecto a la activación de funciones efectoras.

En otra forma de realización, se diseñó uno de los anticuerpos homodiméricos de partida para que no se una a la Proteína A, permitiendo así separar el anticuerpo heterodimérico del anticuerpo homodimérico de partida haciendo pasar el producto sobre una columna de proteína A, eliminando el flujo y eluyendo el anticuerpo heterodimérico de la columna de proteína A, para obtener una composición de anticuerpo heterodimérico purificado.

Tal como se describió más arriba, las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 de los anticuerpos homodiméricos de partida pueden ser diferentes y tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 sea más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3. Se proporcionan más detalles sobre estas interacciones y cómo se pueden lograr en los documentos WO2011131746 y WO2013060867 (Genmab), que se incorporan en su totalidad al presente documento a modo de referencia.

En particular, se puede obtener un anticuerpo CD3xCD30 biespecífico estable con alto rendimiento usando el método anterior de la invención sobre la base de dos anticuerpos de partida homodiméricos que se unen a CD30 y CD3, respectivamente, y contienen sólo unas pocas mutaciones asimétricas, bastante conservadoras, en la regiones CH3. Las mutaciones asimétricas significan que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 contienen sustituciones de aminoácidos en posiciones no idénticas.

Los anticuerpos multiespecíficos, tales como biespecíficos, de la invención también se pueden obtener mediante coexpresión de construcciones que codifican el primer y segundo polipéptidos en una única célula.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una construcción de ácido nucleico, o a una combinación de construcciones de ácido nucleico, que codifica un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención y a un vector de expresión, o una combinación de vectores de expresión, que comprende tal(es) constructo(s) de ácido nucleico.

Además, la invención se refiere a una célula hospedante recombinante capaz de producir el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en donde la célula hospedante comprende una o más construcciones de ácido nucleico que codifican el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención.

Por consiguiente, la invención también se refiere a un método para producir un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que comprende:

- (i) cultivar una célula hospedante recombinante de la invención en condiciones en las que se produce el anticuerpo, y
- (ii) aislar el anticuerpo multiespecífico producido a partir del cultivo.

En una forma de realización, dicho método comprende los siguientes pasos:

- a) proporcionar una primera construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una primera región Fc y una primera región de unión a antígeno de una primera cadena pesada de anticuerpo, comprendiendo dicha primera región Fc una primera región CH3,
 - b) proporcionar una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una segunda región Fc y una segunda región de unión a antígeno de una segunda cadena pesada de anticuerpo, comprendiendo dicha segunda región Fc una segunda región CH3,
- en donde las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3, opcionalmente en donde dichas primera y segunda construcciones de ácido nucleico codifican secuencias de cadena ligera de dichos primer y segundo anticuerpos
- c) coexpresar dichas primera y segunda construcciones de ácido nucleico en una célula hospedante, y
 - d) obtener dicha proteína heterodimérica a partir del cultivo celular.

De preferencia, el aminoácido codificado en la posición correspondiente a F405 es L en la primera región CH3 y el aminoácido codificado en la posición correspondiente a K409 es R en la segunda región CH3, o viceversa.

Los vectores de expresión adecuados, incluidos promotores, potenciadores, etc., y células hospedantes adecuadas para la producción de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de células hospedantes incluyen células de levadura, bacterianas y de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células humanas, tales como células de riñón embrionario humano (HEK).

El ácido nucleico, o uno o más ácidos nucleicos, tal como se define en el presente documento, puede ser ARN o ADN. El ácido nucleico, o uno o más ácidos nucleicos, tal como se define en el presente documento, puede usarse en la expresión en células de mamífero. Por lo tanto, además, la invención proporciona una o más células que comprenden un ácido nucleico, o que comprenden uno o más ácidos nucleicos, tal como se define en el presente documento.

El ácido nucleico en el contexto de la presente invención puede ser un vector de expresión, que puede ser cualquier vector adecuado, incluidos vectores de ácido nucleico cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos y vectores de ácidos nucleicos virales (ARN o ADN). En una forma de realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo CD30 o CD3 está comprendido en un vector de ADN o ARN

desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (tal como se describe, por ejemplo, en Sykes y Johnston, "Nat Biotech" 17, 355 59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo (tal como se describe, por ejemplo, en Schakowski *et al.*, Mol Ther 3, 793 800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, como una construcción precipitada CaP04 (tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO200046147, Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83.9551 55 (1986), Wigler *et al.*, Cell 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, "Somatic Cell Genetics" 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y su uso son bien conocidos en la técnica (referirse, por ejemplo, a los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una forma de realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo CD30 y/o el anticuerpo CD3 en una célula bacteriana. Ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, "J. Biol. Chem.", 264, 5503 5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison, WI) y similares).

Un vector de expresión puede ser, en forma adicional o alternativa, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel *et al.*, ed. "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley InterScience, Nueva York (1987)), y Grant *et al.*, "Methods in Enzymol.", 153, 516 544 (1987)).

Un ácido nucleico y/o vector de expresión también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigir un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica nascente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias son conocidas en la técnica e incluyen péptidos señal o guía de secreción. El ácido nucleico y/o el vector de expresión pueden comprender cualquier elemento adecuado que facilite la expresión, es decir, la transcripción y/o traducción del ácido nucleico de manera que se expresen los componentes de los anticuerpos (bienespecíficos). El ácido nucleico y/o el vector se asociarán con cualquier promotor, potenciador y otros elementos que faciliten la expresión adecuados. Ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador de CMV IE humano así como promotores RSV, SV40, SL3 3, MMTV y VIH LTR), secuencias de terminación poli (A) efectivas, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en contraposición a un promotor constitutivo tal como CMV IE.

Composiciones y usos (médicos)

Además, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo tal como se define en el presente documento. De preferencia, dicha composición es una composición farmacéutica, es decir que el anticuerpo está comprendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se puede formular una composición farmacéutica de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas por Remington en "The Science and Practice of Pharmacy", 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir, por ejemplo, diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (como ser un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (como ser azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica se puede administrar mediante cualquier vía y modo adecuados. En una forma de realización, esa composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

El anticuerpo, composición o composición farmacéutica de acuerdo con la invención se utiliza, de preferencia, como un medicamento.

El anticuerpo, composición o composición farmacéutica de acuerdo con la invención es, de preferencia, para su uso en el tratamiento de enfermedades.

En particular, los anticuerpos biespecíficos de la invención se pueden usar para el tratamiento de diversas formas de cáncer.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multiespecífico de la presente invención. En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para tratar un trastorno que involucra células que expresan CD30, en un sujeto, método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo multiespecífico de la presente invención.

Tal como se dijo, las enfermedades adecuadas que pueden contemplarse en los métodos y usos de acuerdo con la invención son el cáncer. Dicho cáncer se caracteriza de máxima preferencia por la expresión de CD30. La expresión de CD30 en un cáncer se puede determinar fácilmente usando métodos conocidos en la técnica, tales como PCR, inmunotinción o análisis FACS, es decir, detectando la expresión del transcrito y/o la proteína CD30. Los anticuerpos tales como se describen en el presente documento que son capaces de unirse a CD30 humano se pueden usar, por ejemplo, en inmunotinción y/o análisis FACS o similares.

En un aspecto, la invención se refiere al anticuerpo, composición o composición farmacéutica multiespecífica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del linfoma de Hodgkin o del linfoma anaplásico de células grandes.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al anticuerpo, composición o composición farmacéutica multiespecífica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del linfoma de Hodgkin (HL) o del linfoma no Hodgkin (NHL).

En una forma de realización, el linfoma de Hodgkin es un linfoma de Hodgkin clásico (cHL).

En una forma de realización, el linfoma no Hodgkin es un linfoma no Hodgkin de linfocitos T (T-NHL) o un linfoma no Hodgkin de linfocitos B (B-NHL). En una forma de realización adicional, el linfoma no Hodgkin es un linfoma no Hodgkin de linfocitos T (T-NHL).

En una forma de realización adicional, el linfoma no Hodgkin de linfocitos T es un linfoma periférico de linfocitos T (PTCL) o un linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL). En otra forma de realización más, el linfoma no Hodgkin de linfocitos T (T-NHL) es un linfoma anaplásico de células grandes (ALCL). En otra forma de realización más, el linfoma periférico de linfocitos T (PTCL) es un linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

En una forma de realización, el linfoma no Hodgkin de linfocitos B (B-NHL) es un linfoma de células del manto (MCL).

Incluso en una forma de realización más, el linfoma de Hodgkin (HL) es un linfoma de Hodgkin refractario y recidivante. En una forma de realización adicional, el linfoma de Hodgkin (HL) es un linfoma de Hodgkin CD30+. En otra forma de realización más, el linfoma de Hodgkin (HL) es un linfoma de Hodgkin CD30+ recidivante y refractario. En otra forma de realización adicional, el linfoma de Hodgkin (HL) es un linfoma de Hodgkin clásico CD30+ refractario y recidivante.

Incluso en otra forma de realización, el linfoma no Hodgkin (NHL) es un linfoma no Hodgkin refractario y recidivante. En una forma de realización adicional, el linfoma no Hodgkin (NHL) es un linfoma no Hodgkin CD30+. En aún otra forma de realización, el linfoma no Hodgkin (NHL) es un linfoma no Hodgkin CD30+ recidivante y refractario.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo multiespecífico, la composición o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del linfoma de Hodgkin (HL) o del linfoma no Hodgkin (NHL) se administra o se ha administrado por vía intravenosa y/o subcutánea, de preferencia, por vía subcutánea.

En una forma de realización adicional, un paciente diagnosticado de cáncer puede ser sometido a una evaluación de la expresión de CD30 en las células cancerosas, y cuando se detecta CD30, que puede estar en el intervalo de bajo a alto, dicho paciente puede ser seleccionado para el tratamiento con un anticuerpo de acuerdo con la invención. Sin embargo, puede que no sea necesariamente un requisito incluir dicha evaluación al seleccionar un paciente para el tratamiento.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos que implican células que expresan CD30. Por ejemplo, se pueden administrar los anticuerpos a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos, por ejemplo, *in*

vivo, para tratar, prevenir y/o diagnosticar una variedad de trastornos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir individuos humanos y no humanos.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización descritas en el presente documento.

En una forma de realización, la composición de diagnóstico es un diagnóstico complementario que se usa para detectar y seleccionar aquellos pacientes que se beneficiarán del tratamiento con el anticuerpo multiespecífico.

Kits

La invención proporciona, además, un kit que comprende un anticuerpo tal como se describió más arriba, como ser un kit para su uso como diagnóstico complementario/para identificar dentro de una población de pacientes, a aquellos pacientes que tienen una propensión a responder al tratamiento con un anticuerpo como el definido más arriba en el presente documento, o para predecir la eficacia o actividad antitumoral de dicho anticuerpo cuando se lo uso en el tratamiento de un paciente, comprendiendo el kit un anticuerpo como el definido más arriba; e instrucciones de uso de dicho kit.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un kit para el diagnóstico de cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo CD3xCD30 multiespecífico y uno o más reactivos para detectar el entrecruzamiento de células que expresan CD30 y células que expresan CD3. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas u otras etiquetas detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas dan un producto que puede visualizarse.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para detectar si se produce reticulación entre células que expresan CD30 y CD3 en una muestra derivada de un paciente, después de la administración de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización descritas en el presente documento, que comprende los pasos de:

- (i) poner en contacto la muestra con un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización descritas en el presente documento en condiciones que permitan la formación de un complejo entre dicho anticuerpo biespecífico y las células que expresan CD30 y las células que expresan CD3; y
- (ii) analizar si se ha formado un complejo.

Administración de construcciones de ácido nucleico y vehículos de administración

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la administración de construcciones de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la invención para su expresión *in vivo*. Para

la expresión *in vivo* del ácido nucleico que codifica el anticuerpo, dicho ácido nucleico normalmente se administra en una forma adecuada para que el ácido nucleico ingrese en las células del sujeto. Existen diferentes métodos para administrar un ácido nucleico para su expresión *in vivo* e incluyen métodos que implican medios mecánicos y químicos. Por ejemplo, dichos métodos pueden implicar la electroporación o el tatuaje del ácido nucleico en la piel (Patel *et al.*, 2018, "Cell Reports" 25, 1982-1993). Otros métodos adecuados para la administración del ácido nucleico a un sujeto implican la administración del ácido nucleico en una formulación adecuada.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un vehículo de administración que comprende un ácido nucleico o una combinación de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. En algunas formas de realización, dicho vehículo de administración puede ser una formulación lipídica. Los lípidos de la formulación pueden ser partículas, tales como nanopartículas lipídicas (LNP). El ácido nucleico o la combinación de ácidos nucleicos del presente documento puede encapsularse dentro de dicha partícula, por ejemplo, dentro de dichas LNP. Los expertos en la técnica conocen bien diferentes formulaciones lipídicas adecuadas para la administración de un ácido nucleico a un sujeto para su expresión *in vivo*. Por ejemplo, dicha formulación lipídica puede comprender, de forma habitual, lípidos, aminolípidos ionizables, PEG-lípidos, colesterol o cualquier combinación de los mismos.

Son bien conocidas en la técnica, diversas formas y métodos para la preparación de formulaciones lipídicas adecuadas para la administración de un ácido nucleico a un sujeto para la expresión de un anticuerpo terapéutico. Ejemplos de dichas formulaciones lipídicas incluyen, sin que la enumeración sea excluyente, las descritas en los documentos US20180170866 (Arcturus), EP 2391343 (Arbutus), WO 2018/006052 (Protiva), WO2014152774 (Shire Human Genetics), EP 2 972 360 (Translate Bio), US10195156 (Moderna) y US20190022247 (Acuitas).

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una o más construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la invención o a un vehículo de administración de acuerdo con la invención para su uso como medicamento, de preferencia, para su uso en el tratamiento del cáncer, tal como en el tratamiento del linfoma de Hodgkin o del linfoma anaplásico de células grandes.

La presente invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 por intercambio de brazos Fab inducido por 2-MEA

En los ejemplos, se usaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos CD3 humanizados

IgG1-huCD3-H1L1 según se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2015/001085 (Genmab). IgG1-huCD3-H1L1 se denomina en el presente documento como "IgG1-huCD3".

IgG1-huCD3-H1L1-H101G según se describe en el Ejemplo 2 del documento WO2017/009442 (Genmab). IgG1-huCD3-H1L1-H101G se denomina en el presente documento como "IgG1-huCD3-H101G".

Anticuerpos CD30

MDX-060, también denominado HuMab 5F11, se ha descrito en el documento WO2003/059282 (Medarex). hAC10 (o SGN-30) se ha descrito en los documentos US 8257706 y US20100239571 (Seattle Genetics). HRS-3 se ha descrito en WO2016/0177846 (Affimed). HeFi-I, T405, T105, T408 y T215 se han descrito en el documento WO 2007/040653 (US government & Health).

Expresión de anticuerpos

Se clonaron secuencias de anticuerpos en vectores de expresión pcDNA3.3 (Invitrogen, EE. UU.) y se expresaron como IgG1, κ o IgG1, λ , con o sin silenciamiento de Fc y/o sustituciones de aminoácidos con tecnología DuoBody® en el dominio Fc (ver más abajo). Todos los anticuerpos se produjeron en condiciones libres de suero mediante la cotransfección de vectores de expresión de cadenas pesadas y ligeras relevantes en células Expi293FTM (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.; n.º de cat. A14527) utilizando ExpiFectamine™ 293 (Thermo Fisher Scientific; n.º de cat. A14525), esencialmente según la descripción del fabricante.

Generación de anticuerpos biespecíficos

Se generaron anticuerpos biespecíficos *in vitro* utilizando la tecnología de plataforma DuoBody®, es decir, intercambio de brazo Fab controlado inducido por 2-MEA (cFAE) tal como se describe en los documentos WO2011147986, WO2011131746 y WO2013060867 (Genmab) y Labrijn *et al.* (Labrijn *et al.*, PNAS 2013, 110: 5145-50; Gramer *et al.*, MAbs 2013, 5: 962-973). Para permitir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante este método, se generaron moléculas IgG1 que portaban una única mutación en el dominio CH3: en un anticuerpo IgG1 parental, la mutación F405L (es decir, los anticuerpos CD3 o los anticuerpos de control, específicos de gp120 del VIH-1), en el otro anticuerpo IgG1 parental, la mutación K409R (es decir, el CD30 o anticuerpos de control). Además de estas mutaciones, los anticuerpos IgG1 parentales incluían sustituciones que dan como resultado un dominio Fc que no puede interactuar con los receptores Fc de IgG (receptores Fc gamma) y/o factores del complemento como C1q: L234F, L235E, D265A (FEA; EE. UU. 2015/0337049) o L234F, L235E, G236R (FER).

La combinación de silenciamiento de Fc y mutaciones de la tecnología DuoBody® se designó de la siguiente manera:

L234F, L235E, D265A, y F405L: FEAL
L234F, L235E, D265A, y K409R: FEAR
L234F, L235E, G236R, y K409R: FERR

Las secuencias de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) de los anticuerpos parentales se exponen en los siguientes SEQ ID N.º:

IgG1-huCD3-FEAL:	SEQ ID N.º 19 (HC) y SEQ ID N.º 20 (LC).
IgG1-huCD3-H101G-FEAL:	SEQ ID N.º 35 (HC) y SEQ ID N.º 20 (LC).
IgG1-CD30-MDX060-FERR:	SEQ ID N.º 17 (HC) y SEQ ID N.º 18 (LC).
IgG1-CD30-MDX060-FEAR:	SEQ ID N.º 55 (HC) y SEQ ID N.º 18 (LC).
IgG1-CD30-hAC10-FEAR:	SEQ ID N.º 21 (HC) y SEQ ID N.º 22 (LC).
IgG1-CD30-HRS-3-FEAR:	SEQ ID N.º 35 (HC) y SEQ ID N.º 24 (LC).
IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR:	SEQ ID N.º 25 (HC) y SEQ ID N.º 26 (LC).
IgG1-CD30-T405-FEAR:	SEQ ID N.º 27 (HC) y SEQ ID N.º 28 (LC).
IgG1-CD30-T105-FEAR:	SEQ ID N.º 29 (HC) y SEQ ID N.º 30 (LC).
IgG1-CD30-T408-FEAR:	SEQ ID N.º 31 (HC) y SEQ ID N.º 32 (LC).
IgG1-CD30-T215-FEAR:	SEQ ID N.º 33 (HC) y SEQ ID N.º 34 (LC).

Para generar anticuerpos biespecíficos, se mezclaron los dos anticuerpos parentales en relaciones molares iguales en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato; HPO_4^{2-} 8,7 mM, H_2PO_4^- 1,8 mM, Na^+ 163,9 mM, Cl^- 140,3 mM, pH 7,4). Se añadió 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) hasta una concentración final de 75 mM y se incubó la mezcla de reacción a una temperatura de 31 °C durante 5 horas. Se eliminó 2-MEA mediante diálisis en tampón PBS utilizando casetes Slide-A-Lyzer de corte de peso molecular de 10 kDa (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se almacenaron las muestras durante la noche a una temperatura de 4 °C para permitir la reoxidación de los enlaces disulfuro y la formación de anticuerpos biespecíficos intactos. La eficacia de cFAE fue de >95 % de acuerdo con lo evaluado mediante espectrometría de masas por ionización por electropulverización (ESI-MS) como lo describen Gramer *et al.* (MAbs. 1 de noviembre de 2013; 5 (6): 962–973.).

Anticuerpo b12 de control sin unión

IgG1-b12 es un anticuerpo específico gp120 de VIH-1 (Barbas, CF. J Mol Biol., del 5 de abril de 1993; 230(3):812-23) que se usa en algunos de los ejemplos como anticuerpo de control negativo sin unión. La secuencia de la cadena pesada y la secuencia de la cadena ligera se incluyen en el presente documento como SEQ ID N.º 36 y 37, respectivamente (FEAL) o SEQ ID N.º 38 y 37, respectivamente (FERR).

Ejemplo 2 - Expresión de CD30 en linfoma de Hodgkin (HL) humano, linfoma

anaplásico de células grandes (ALCL) y líneas celulares TLL

Se evaluaron los niveles de expresión superficial de CD30 en un panel de líneas celulares HL, ALCL y TLL (Tabla 4) mediante citometría de flujo cuantitativa (kit Human IgG Calibrator, Biopathyx, n.º de catálogo CP010). Se incubaron células (5×10^4 células/pocillo) en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner Bio-one, n.º de catálogo 650180) con $10 \mu\text{g/ml}$ de IgG1-CD30-MDX060-FERR en $50 \mu\text{l}$ de tampón de tinción (PBS [Lonza, n.º de catálogo BE17-517Q] suplementado con albúmina sérica bovina al 0,1 % [BSA, fracción V, Roche, n.º de catálogo 10735086001] y NaN_3 al 0,02 % [Sigma Aldrich, n.º de catálogo 13412]) a una temperatura de 4°C durante 30 minutos. En paralelo, se generó una curva estándar utilizando un kit calibrador de IgG humana (Biopathyx, n.º de catálogo CP010), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron perlas de calibración, que contenían un número bien definido de anticuerpos monoclonales IgG humanos por perla, con el mismo anticuerpo secundario conjugado con R-PE (Jackson ImmunoResearch, Reino Unido; n.º de catálogo 109-116-098; dilución 1:500) a una temperatura de 4°C protegido de la luz durante 30 minutos. Se lavaron las células y las perlas en tampón FACS y se las analizó mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCelesta (BD Biosciences, EE. UU.). Se usó la curva estándar obtenida con el kit calibrador de IgG humana para interpolar el número de anticuerpos IgG1-CD30-MDX060-FERR unidos por célula (ABC) utilizando el software GraphPad Prism, lo que representa una estimación del número de moléculas de CD30 expresadas en la superficie celular.

Las Tablas 4 y 5 muestran que se observó una expresión de CD30 por encima del límite inferior de cuantificación (LLOQ) en todas las líneas celulares excepto en SUP-T1.

Tabla 4: Resumen de líneas celulares y expresión de CD30

Línea celular	Tipo de tumor	Catálogo	Proveedor	Expresión de CD30 (ABC)		
				Mediana	Intervalo	n
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	145.723	61.779 - 271.304	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	120.725	102.787 - 133.437	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	56.578	51.737 - 87.841	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	19.720	17.283 - 29.129	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	15.406	11.102 - 18.333	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4.548	4.054 - 4.838	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127.616	70.495 - 172.019	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104.947	69.630 - 133.464	3

Línea celular	Tipo de tumor	Catálogo	Proveedor	Expresión de CD30 (ABC)		
				Mediana	Intervalo	n
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	124.669	77.610 - 139.598	3
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	122.003	55.416 - 153.484	3
SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	6.129	37.047 - 93.777	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	75.238	72.529 - 80.697	2
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19.399	20.608 - 18.189	2
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

Tabla 5: Resumen de líneas celulares y expresión de CD30 promedio

Línea celular	Tipo de tumor	Catálogo	Proveedor	Expresión de CD30 (ABC)		
				Promedio	Intervalo	n
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	110.301	55.416 - 153.484	3
DL-40	ALCL	JCRB1337	JCRB	98.174	60.392 - 156.229	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	64.510	51.737 - 87.841	3
HH	CTCL	ACC 707	DSMZ	161.740	122.598 - 206.774	3
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19.399	20.608 - 18.189	2
JVM-2	MCL	ACC 12	DSMZ	25.842	12.644 - 43.081	3
KARPAS-299	ALCL	06072604	PHE	91.426	77.730 - 106.058	3
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	118.794	77.610 - 139.598	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	22.044	17.283 - 29.129	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4.480	4.054 - 4.838	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	117.743	102.787 - 133.437	3
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	159.602	61.779 - 271.304	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127.616	70.495 - 172.019	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	14.947	11.102 - 18.333	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104.497	69.630 - 133.464	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	76.613	72.529 - 80.697	2
SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	66.129	37.047 - 93.777	3
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

^a <LLOQ, por debajo del límite inferior de cuantificación (3300 ABC)

Ejemplo 3 - Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a linfoma de Hodgkin (HL) humano y linfoma no Hodgkin (NHL) tales como células de linfoma anaplásico de

células grandes (ALCL)

Se analizó la unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a dos líneas celulares tumorales humanas que expresan CD30, SU-DHL-1 (ALCL; ATCC, n.º de cat. ACC 356) y HDLM-2 (HL; ATCC, n.º de cat. CRL-2965) mediante citometría de flujo.

Se incubaron células (3×10^4 células/pocillo) en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner Bio-one, n.º de catálogo 650180) con diluciones en serie de anticuerpos (intervalo de 0,0046 a 10 µg/ml en pasos de dilución triple) en 50 µl de tampón de tinción a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar dos veces en tampón de tinción, se incubaron las células con 50 µl de anticuerpo secundario a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Como anticuerpo secundario, se utilizó IgG antihumana de cabra conjugada con R-PE (Jackson ImmunoResearch, Reino Unido; n.º de catálogo 109-116-098) diluida en una relación de 1:400 en tampón de tinción. A continuación, se lavaron las células dos veces en tampón de tinción, se resuspendieron en 100 µl de tampón de tinción complementado con yoduro TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific; n.º de catálogo T3605; dilución 1:8000) y se las analizó en un citómetro de flujo FACSCelesta (BD Biosciences), EE. UU.). Se seleccionaron las células vivas de acuerdo con FSC/SSC y la ausencia de tinción con TOPRO-3. Se analizaron las curvas de unión mediante regresión no lineal de datos transformados logarítmicamente (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable, cuatro parámetros) utilizando el software GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

La Figura 1 muestra las curvas de unión dosis-respuesta de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR (A), bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR (B), bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR (C), BsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR (D), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR (E), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR (F), BisIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR (G) y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR (H) a células tumorales SU-DHL-1 (paneles de la izquierda) y HDLM-2 (paneles de la derecha).

A una concentración de 1,11 µg/ml, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR mostraron una unión similar cuando se comparó la unión de los anticuerpos monoespecíficos, bivalentes CD30 IgG1-CD30-MDX060-FEAR, IgG1-CD30-hAC10-FEAR, IgG1-CD30-HRS-3-FEAR e IgG1-CD30-T105-FEAR (Figura 1I).

Por el contrario, a una concentración de 1,11 µg/ml, la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR fue inferior a la unión de los anticuerpos monoespecíficos, bivalentes CD30 parentales IgG1-CD30-T405-FEAR, IgG1-CD30-T408-FEAR e IgG1-CD30-T215-FEAR a las células SU-DHL-1 y HDLM-2 (Figura 1I).

En general, la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-

FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, BsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR a una concentración de 1,11 µg/ml, fue superior a la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR a la misma concentración (Figura 1I).

El anticuerpo de control negativo BsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR que se incluyó en estos experimentos no mostró unión a las células SU-DHL-1 y HDLM-2, lo que indica que ni las células SU-DHL-1 ni HDLM-2 expresan CD3.

En conclusión, los clones de anticuerpos CD30 T405, T408 y T215 mostraron una unión reducida en el formato monovalente en comparación con el bivalente, mientras que los clones MDX060, hAC10, HRS-3 y T105 mostraron una unión eficaz a las células tumorales que expresan CD30 en formato monovalente y bivalente.

La Figura 2 muestra curvas de unión dosis-respuesta de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a células (A) HDLM-2 (HL), (B) L-428 (HL), (C) DEL (ALCL) y (D) KI-JK (ALCL). BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR mostró una unión máxima similar en comparación con el anticuerpo parental monoespecífico bivalente CD30 IgG1-CD30-MDX060-FERR. Los anticuerpos de control negativo bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, IgG1-huCD3-FEAL e IgG1-b12-FEAL no mostraron unión a ninguna de estas líneas celulares, lo que indica que estas células no expresan CD3 en la superficie celular. Estos datos confirmaron la unión eficaz de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a líneas celulares HL y ALCL.

La Tabla 6 muestra los valores de EC₅₀ para la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR a células HDLM-2, L-428, DEL y KI-JK evaluados en dos experimentos independientes. Los valores de EC₅₀ oscilaron entre 0,05 µg/ml y 0,30 µg/ml.

Tabla 6: Valores EC₅₀ para la unión de bsG1-huCD3xCD30-MDX060

Línea celular	EC ₅₀ (µg/ml)	
	N = 1	N = 2
HDLM-2	0,1450	0,1197
L-428	0,1539	0,0705
DEL	0,3018	0,0568
KI-JK	0,1602	0,0735

Las Figuras 8, 9 y 10 muestran curvas de unión dosis-respuesta de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a líneas celulares de HL que expresan CD30 (Figura 8), líneas celulares de ALCL (Figura 9) y líneas celulares de NHL (Figura 10). En todas las líneas celulares, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR mostró una unión máxima similar en comparación con el anticuerpo de control monovalente BsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR. El anticuerpo parental monoespecífico bivalente CD30 IgG1-CD30-MDX060-FERR mostró una unión dependiente de la dosis a todas las líneas celulares, pero mostró una unión máxima

más baja en comparación con BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. Los anticuerpos de control negativo bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, IgG1-huCD3-FEAL e IgG1-b12-FEAL no mostraron unión a ninguna de estas líneas celulares, lo que indica que estas células no expresan CD3 en la superficie celular. Estos datos confirmaron la unión eficaz de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a líneas celulares HL, T-NHL como líneas celulares ALCL y CTCL; y B-NHL tal como la línea celular MCL.

La Tabla 7 muestra los valores de EC₅₀ para la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a líneas celulares HL, T-NHL y B-NHL evaluadas en 2 o 3 experimentos independientes. Los valores de EC₅₀ oscilaron entre 0,12 µg/ml y 0,35 µg/ml.

Tabla 7: Valores EC₅₀ para la unión de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Línea celular		Unión de CD30		
Nombre	Tipo de cáncer	Promedio de EC ₅₀ de unión	Intervalo de EC ₅₀ de unión (µg/ml)	N de pruebas
L-540	HL	0,3229	0,2020 - 0,4694	3
L-428	HL	0,1743	0,1742 - 0,1744	2
KM-H2	HL	0,1587	0,1405 - 0,1824	3
L-1236	HL	0,2019	0,1628 - 0,2247	3
HDLM-2	HL	0,1674	0,1253 - 0,2206	3
L-82	ALCL	0,1999	0,1845 - 0,2153	2
SR-786	ALCL	0,3279	0,1735 - 0,5499	3
KI-JK	ALCL	0,1914	0,1431 - 0,2582	3
SUP-M2	ALCL	0,1667	0,1336 - 0,2225	3
DL-40	ALCL	0,2364	0,1698 - 0,3472	3
DEL	ALCL	0,2011	0,1430 - 0,2674	3
KARPAS-299	ALCL	0,2015	0,1343 - 0,2686	2
SUP-T1	TLL	0,3458	0,2572 - 0,4344	2
JVM-2	MCL	0,1257	0,1068 - 0,1411	3
NCEB-1	MCL	0,1564	0,1180 - 0,2000	3
HH	CTCL	0,1951	0,1559 - 0,2425	3

Ejemplo 4 - Inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T y proliferación de linfocitos T *in vitro* por anticuerpos biespecíficos CD3xCD30

Se sometieron a prueba anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en un ensayo de

citotoxicidad *in vitro* utilizando líneas celulares tumorales positivas para CD30 como células diana y linfocitos T como células efectoras. Como fuente de linfocitos T, se usaron células efectoras ADCC positivas para CD3 tipo IV (Clean Cells, Montaigu, Francia) o linfocitos T purificados (tal como se describe en el Ejemplo 5) para evaluar la destrucción de células tumorales dependientes de CD3.

Se sembraron células SU-DHL-1 (ALCL), HuT78 (ALCL), HDLM-2 (HL), NCEB-1 (MCL) o L540 (HL) a una densidad de 10.000 células/pocillo en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-one, n.º de cat. 650180). Se marcaron células efectoras con CFSE 0,5 µM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína; Cell Signaling Technology, Danvers, MA; n.º de cat. C34554) a una temperatura de 37 °C durante 20 minutos y se agregaron a las células tumorales en una relación E:T = 10:1 (células efectoras ADCC) o 7:1 (linfocitos T purificados). Se agregaron diluciones en serie de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30, b12xCD30 o CD3xb12, o anticuerpos monoespecíficos CD30 bivalentes (la concentración final oscilaba entre 10 µg/ml y 0,041 µg/ml; diluciones triples) y se incubaron las células durante 72 horas a una temperatura 37 °C. En algunos experimentos, se usó una variante de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR con un brazo de unión a CD3 que contiene la mutación H101G, que tiene afinidad reducida por CD3 (WO2017/009442, Genmab). Después de lavar dos veces en 100 µl de tampón de tinción, se resuspendieron las células en tampón de tinción que contenía yoduro TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific; n.º de catálogo T3605; dilución 1:4000) y se las analizó en un citómetro de flujo FACSCelesta (BD Biosciences, EE. UU.).

Se fijó la viabilidad de las muestras de células tumorales tratadas con estaurosporina 5 µM (Sigma-Aldrich, EE. UU., n.º de catálogo S6942) en 0 % y se fijó la viabilidad de las muestras de células tumorales no tratadas en 100 %.

Se calculó el "porcentaje de células viables" de la siguiente manera: % de células viables = $\frac{[\text{número de células de la muestra} - \text{número de células de las células diana tratadas con estaurosporina}]}{[\text{número de células de las células diana no tratadas} - \text{número de células de las células diana tratadas con estaurosporina}]} \times 100$.

Se contaron células CFSE positivas como una medida del número absoluto de linfocitos T para evaluar la proliferación de linfocitos T.

Se analizaron las curvas dosis-respuesta mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

Se sometieron a prueba anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando líneas celulares tumorales positivas para CD30, células SU-DHL-1 o células HDLM-2 como células diana y células efectoras ADCC de tipo IV (Clean Cells, Montaigu, Francia) como células efectoras.

La Figura 3 muestra que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR (A), bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR (B), bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR (C), BsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR (D), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR (E), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR (F), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR (G), y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR (H) indujeron citotoxicidad mediada por linfocitos T dependientes de la dosis (que se muestra como una disminución en el porcentaje de células viables) de células SU-DHL-1 (paneles de la izquierda) o HDLM-2 (paneles de la derecha).

Los anticuerpos monoespecíficos bivalentes CD30 IgG1-MDX060-FEAR (A), IgG1-CD30-hAC10-FEAR (B), IgG1-CD30-HRS-3-FEAR (C), IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR (D), IgG1-CD30-T405-FEAR (E), IgG1-CD30-T105-FEAR (F), IgG1-CD30-T408-FEAR (G) e IgG1-CD30-T215-FEAR (H) no indujeron citotoxicidad mediada por linfocitos T. El anticuerpo de control bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR tampoco indujo citotoxicidad mediada por linfocitos T de células SU-DHL-1 o HDLM-2.

Además, se sometieron a prueba los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando diferentes líneas celulares MCL, ALCL y HL como células diana y linfocitos T purificados o células efectoras ADCC tipo IV como células efectoras. Las Figuras 4A-B muestran que la citotoxicidad mediada por linfocitos T de células SU-DHL-1, HuT78 o NCEB-1 inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR es más potente en comparación con una variante de este anticuerpo con unión al brazo CD3 con afinidad reducida (bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR). Se indujo una citotoxicidad máxima similar mediada por linfocitos T de células HDLM-2 por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR y bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR (Figura 4B). La incubación con anticuerpos monoespecíficos bivalentes IgG1-huCD3-FEAL o IgG1-b12-FEAR, que se incluyeron como controles, no indujo citotoxicidad en estas líneas celulares. Se indujo una citotoxicidad potente y similar mediada por linfocitos T de células L540 por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR y bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR a la concentración más baja probada (0,014 µg/ml; Figura 4C). Los anticuerpos de control bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR o IgG1-MDX060-FEAR no indujeron citotoxicidad mediada por linfocitos T de las células L540.

En conclusión, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR indujo una potente destrucción de varias líneas celulares tumorales MCL, ALCL y HL que expresan CD30. BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR que contiene una H en la posición 101 de VH CDR3 del brazo CD3 es más potente para destruir células tumorales MCL y ALCL que expresan CD30 en comparación con la variante con el brazo CD3 de menor afinidad que contiene G en la posición 101.

En los ensayos de citotoxicidad que utilizan células HDLM-2 (panel de la izquierda) o células NCEB-1 (panel de la derecha) como células diana, se evaluó el número de células CFSE positivas como una medida del recuento absoluto de linfocitos T. La Figura 4D muestra que la citotoxicidad mediada por linfocitos T de células HDLM-2 y NCEB-1 inducida por bsG1-

huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR o bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR (referirse a la Figura 4B) se asoció con un aumento dependiente de la dosis en el recuento de linfocitos T. En general, se contaron las cantidades de linfocitos T similares después de la incubación con bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR o bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR en este ensayo. Se observó una reducción del número de linfocitos T en cocultivos con células NCEB-1 incubadas con bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR en concentraciones superiores a 1 µg/ml. El anticuerpo de control IgG1-b12-FEAL no afectó los recuentos de linfocitos T en estos experimentos.

En conclusión, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR indujo la proliferación de linfocitos T en presencia de varias líneas celulares tumorales ALCL, HL y MCL que expresan CD30.

Ejemplo 5 - Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a CD30 humano, de mono cynomolgus o mono rhesus expresado en células Expi293F

Se analizó la unión de anticuerpos CD3xCD30 biespecíficos y anticuerpos CD30 monoespecíficos bivalentes a la membrana plasmática de células Expi293 transfectadas transitoriamente con CD30 humano o CD30 de mono cynomolgus mediante citometría de flujo.

Expresión transitoria de CD30 humano, de mono cynomolgus o mono rhesus en células HEK-293F o HEK-293

Se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para la expresión de diversas variantes de CD30 de longitud completa: CD30 humano (*Homo sapiens*) (huCD30; número de acceso de Uniprot P28908), CD30 de mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (mfCD30; número de acceso de Uniprot A0A2K5VW07) (SEQ ID N.º 40) y mono rhesus (*Macaca mulatta*) CD30 (mmCD30; n.º de acceso Uniprot A0A1D5RK03) (SEQ ID N.º 41). Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia Kozak óptima (GCCGCCACC) (Kozak, M., "Gene" 1999; 234(2):187-208). Se clonaron las construcciones con codones optimizados de CD30 humano, de mono cynomolgus y mono rhesus de longitud completa en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3.3 (Invitrogen) y se las expresó utilizando la plataforma de expresión Expi293F (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU., n.º de cat. A14527) esencialmente según la descripción del fabricante. En otro grupo de experimentos, se expresaron las construcciones CD30 humanas de longitud completa o CD30 de mono cynomolgus en células HEK-293.

Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a CD30 humano, de mono cynomolgus o mono rhesus expresado en células Expi293

Se incubaron células (3x10⁴ células/pocillo) en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (Greiner bio-one, n.º de catálogo 650180) con diluciones en serie de

anticuerpos (que oscilan entre 0,005 µg/ml y 10 µg/ml en pasos de dilución de 3 repeticiones) en 100 µl de tampón de tinción a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Los experimentos se realizaron por duplicado técnico. Después de lavar dos veces en tampón de tinción, se incubaron las células en 50 µl de anticuerpo secundario a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Como anticuerpo secundario, se utilizó IgG antihumana de cabra conjugada con R-PE (Jackson ImmunoResearch, Reino Unido; n.º de catálogo 109-116-098) diluida 1:400 en tampón de tinción. Se lavaron las células dos veces en tampón de tinción, se las resuspendió en 30 µl de tampón de tinción que contenía EDTA al 0,4 % y se las analizó en un aparato iQue Screener (Intellicyt Corporation, EE. UU.). Se analizaron las curvas de unión mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a CD30 humano, de mono cynomolgus o mono rhesus expresado en células HEK293

Se incubaron las células (3×10^4 células/pocillo) en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Thermo Scientific, n.º de catálogo 163320) con diluciones en serie de anticuerpos (que oscilan entre 0,0002 µg/ml y 50 µg/ml en pasos de dilución de 4 repeticiones) en 50 litros de tampón de tinción a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Los experimentos se realizaron por duplicado técnico. Después de lavar dos veces en tampón de tinción, se incubaron las células en 50 µl de anticuerpo secundario a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Como anticuerpo secundario, se utilizó IgG antihumana de cabra conjugada con R-PE (Jackson ImmunoResearch, Reino Unido; n.º de catálogo 109-116-098) diluida 1:200 en tampón de tinción. Se lavaron las células dos veces en tampón de tinción, se las resuspendió en 30 µl de tampón de tinción que contenía EDTA al 0,4 % y el marcador de viabilidad ToPro-3 (Invitrogen, n.º de catálogo T3605) diluido 1:10.000. Se analizaron las células en un aparato iQue Screener (Intellicyt Corporation, EE. UU.). Se analizaron las curvas de unión mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 a linfocitos T humanos o PBMC de mono cynomolgus

Se sembraron PBMC de mono cynomolgus (Tebu-Bio, Países Bajos; n.º de catálogo PBMCMA-10) o linfocitos T humanos purificados en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo. Los linfocitos T derivaron de capas leucocitarias de donantes humanos (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) y se los aisló utilizando el cóctel de enriquecimiento de linfocitos T humanos RosetteSep (Stemcell Technologies, Francia, n.º de catálogo 15061) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron las células (3×10^4 células/pocillo) con diluciones en serie (que oscilan entre 0,0001 µg/ml y 10 µg/ml en pasos de dilución de 3 repeticiones) de anticuerpos IgG1-CD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-

FEAR y bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR en 50 µl de tampón de tinción a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar dos veces en tampón de tinción, se incubaron las células en 50 µl de anticuerpo IgG antihumano de cabra conjugado con R-PE secundario a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos (dilución 1:400). Después de lavar dos veces en tampón de tinción, se tiñeron los linfocitos T para determinar los marcadores de linfocitos T CD3 (1:100; Miltenyi Biotec, clon 10D12, conjugado con APC), CD4 (1:50; eBioscience, clon OKT4, conjugado con APC-Cy7), CD8 (1:100; Biolegend, clon RPA-T8, conjugado con AF700) y los marcadores de activación de linfocitos T CD69 (1:50; BD Biosciences, clon AB2439, conjugado con FITC), CD25 (1:50; eBioscience, clon BC96, conjugado con PE-Cy7) y CD279/PD1 (1:50; BD Biosciences, clon AEH12.2H7, conjugado con BV605). Se utilizaron muestras teñidas individuales con perlas Ultracomp (5 µl; Invitrogen, n.º de catálogo 01-2222-42) para los ajustes de compensación del citómetro de flujo. Después de 30 minutos de incubación a una temperatura de 4 °C, se lavaron las células dos veces con tampón de tinción, se las resuspendió en 100 µl de tampón de tinción y se las analizó utilizando un FACS Fortessa (BD Biosciences). Los datos se procesaron utilizando FlowJo (BD Biosciences).

Resultados

Los anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD30 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR y bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR no mostraron unión a células Expi293F de tipo salvaje (Figura 5A) pero sí mostraron una unión dependiente de la dosis a células Expi293F transfectadas con huCD30 (Figura 5B) o mfCD30 (Figura 5C). La unión de estos anticuerpos biespecíficos fue comparable a la unión del anticuerpo CD30 monoespecífico bivalente IgG1-CD30-MDX060-FEAR. Como se esperaba, el anticuerpo de control negativo bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR no mostró unión a células Expi293F transfectadas con huCD30 o mfCD30 de tipo salvaje o transfectadas con mfCD30. De manera similar, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR mostró una unión dependiente de la dosis a células HEK293 transfectadas con huCD30 (Figura 11A) o mfCD30 (Figura 11B), el anticuerpo de control negativo bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR no mostró unión a células huCD30 o células HEK293 transfectadas con mfCD30. Esto indica que el anticuerpo MDX060 dirigido a CD30 se une eficazmente al CD30 humano y de mono cynomolgus expresado en células HEK en un formato bivalente y monovalente.

La Figura 5D muestra que el anticuerpo biespecífico CD3xCD30 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR y el anticuerpo biespecífico de control bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR se unieron eficazmente a linfocitos T primarios humanos y de mono cynomolgus. Esto muestra que estos anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD3 se unen eficazmente a CD3 tanto humano como de mono cynomolgus expresado de forma endógena en linfocitos T. El anticuerpo parental bivalente IgG1-CD30-MDX060 no se unió a los linfocitos T humanos o de mono cynomolgus, lo que indica que CD30 no se expresó en estas células.

Se evaluó la unión del panel de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 y los anticuerpos

monoespecíficos CD30 parentales a células Expi293F transfectadas con huCD30 o mmCD30 mediante citometría de flujo. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR (Figura 6A), bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR (Figura 6B), bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR (Figura 6C), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR (Figura 6E), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR (Figura 6F), bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR (Figura 6G), y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR (Figura 6H) mostraron la misma unión a células que expresaban huCD30 o mmCD30. De manera similar, los clones de anticuerpo CD30 monoespecíficos parentales mostraron una unión igual a las células que expresan huCD30 o mmCD30. Por el contrario, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR y el anticuerpo CD30 monoespecífico parental IgG1-CD30-HeFi-I_FEAR mostraron unión a huCD30, pero no a mmCD30 (Figura 6D).

Ejemplo 6 – Evaluación de la estabilidad conformacional de variantes de anticuerpos no activadores monoespecíficos y biespecíficos por análisis DSF

Se evaluaron las características de estabilidad de las proteínas de las variantes de anticuerpos IgG1 bivalentes monoespecíficos CD30, CD3 y biespecíficos CD3xCD30 que albergan mutaciones no activadoras en la región constante de la cadena pesada mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF).

Se formularon muestras de IgG1-CD30-MDX060-FEAR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL y BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en PBS, a un pH de 7,4, a una concentración de alrededor de 1 mg/ml.

Para evaluar la estabilidad conformacional, se llevó a cabo una DSF en un sistema de detección por PCR en tiempo real iQ5 Multicolor (Bio-Rad) capaz de detectar cambios en la intensidad de la fluorescencia causados por la unión del colorante extrínseco Sypro-Orange (concentrado 5000x en DMSO, n.º de cat. S5692, Sigma-Aldrich) a regiones hidrófobas establecidas al desplegarse IgG. Sypro-Orange se diluyó 320 veces en PBS, con un pH de 7,4 (Hyclone GE Healthcare). Se puede derivar una curva de fusión térmica midiendo la fluorescencia creciente durante la desnaturalización térmica controlada y gradual de la IgG analizada. Por lo tanto, se agregaron muestras duplicadas de 5 µl de solución de anticuerpos (1 mg/ml en PBS) a 20 µl de Sypro-Orange diluido en PBS con un pH de 7,4 en placas de PCR de 96 pocillos iQ. Se registró la fluorescencia a temperaturas crecientes que oscilaban entre 25 °C y 95 °C, en incrementos graduales de 0,5 °C por incremento y con una duración de 15 segundos más el tiempo necesario para registrar la fluorescencia de todos los pocillos. Se analizaron los datos utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.0 y el software determinó los puntos de fusión a partir de los gráficos de fluorescencia frente a la temperatura.

Resultado

La Figura 7 y la Tabla 8 muestran que la temperatura de fusión (T_m) de IgG1-CD30-MDX060-FERR es de 69,0 °C, que es mayor que la T_m de IgG1-CD30-MDX060-FEAR a pH 7,4

(64,5 °C). Esto indica que IgG1-CD30-MDX060-FERR tiene una mayor estabilidad conformacional que IgG1-CD30-MDX060-FEAR, lo que sugiere que IgG1-CD30-MDX060, que contiene una estructura principal de FER, tiene una mayor estabilidad conformacional que IgG1-CD30-MDX060 que contiene una estructura principal de FEA. Se determinó que la temperatura de fusión de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR era de 64,5 °C, que se encuentra entre la T_m determinada para los dos anticuerpos parentales IgG1-huCD3-FEAL (62,5 °C) e IgG1-CD30-MDX060-FERR (69,0 °C).

Tabla 8: Temperaturas de fusión (T_m) de los anticuerpos indicados determinadas por fluorimetría diferencial de barrido (DSF)

Anticuerpo	T _m (°C)
IgG1-CD30-MDX060-FEAR	64,5
IgG1-CD30-MDX060-FERR	69,0
IgG1-huCD3-FEAL	62,5
BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR	64,5

Ejemplo 7 - Unión simultánea de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a linfocitos T y células tumorales

Se estudió la unión simultánea de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a células tumorales y linfocitos T vírgenes.

Se descongelaron los linfocitos T congelados aislados de donantes sanos y se los marcó con Celltrace violeta 0,25 mM (Pacific Blue; Invitrogen, n.º de catálogo C34557A) a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos. Se marcaron las células tumorales L-428 con Celltrace FarRed (APC; Invitrogen n.º de cat. C34564A) a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos y se las agregó a los linfocitos T en una relación E:T de 1:1. Se agregaron diluciones en serie de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR o anticuerpos de control bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1b12FEALxCD30MDX060-FERR o IgG1-b12-FEAL (la concentración final oscila entre 6×10^{-5} y 10 µg/ml; diluciones triples) y se incubaron las células durante 2 horas a una temperatura de 4 °C. Después de la incubación, se añadió el marcador de viabilidad 7-AAD (BD Bioscience, n.º de catálogo 559925) (dilución final 100x) y se analizaron las células en un citómetro de flujo FACS Celesta (BD Biosciences).

Resultados

La Figura 12 muestra que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR induce la formación de eventos doble positivo CD3⁺CD30⁺ (células que expresan CellTrace Far Red y CellTrace Violet en tinción por citometría de flujo) como medida para entrecruzamiento mediado por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR de células tumorales a linfocitos T (unión

simultánea). El aumento de eventos doble positivo dependió de la concentración de anticuerpos y mostró una curva en forma de campana. No se observó ningún aumento en el entrecruzamiento de células tumorales y linfocitos T en muestras incubadas con anticuerpos control bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, bsG1b12FEALxCD30MDX060-FERR o IgG1-b12-FEAL o en muestras incubadas sin anticuerpo (A). La Figura 12 B muestra la unión simultánea de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR a células tumorales y linfocitos T vírgenes, de acuerdo con lo detectado por el porcentaje de células que expresan CellTrace Far Red y CellTrace Violet (B).

Estos datos indican que bsG1huCD3FEALxCD30-MDX060-FERR puede unirse y entrecruzar simultáneamente células tumorales CD30⁺ y linfocitos T CD3⁺.

Ejemplo 8 – Inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T y activación de linfocitos T *in vitro* por anticuerpos biespecíficos CD3xCD30

Se evaluó la citotoxicidad mediada por linfocitos T de las células tumorales Karpas-299 y la activación de linfocitos T asociada mediante un panel de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30. Se evaluaron los siguientes anticuerpos: bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, bsG1- huCD3-FEALx CD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALx CD30-T408-FEAR y bsG1-huCD3-FEALx CD30- T215-FEAR.

Se obtuvieron linfocitos T de capas leucocitarias de donantes humanos sanos (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) y se los analizó utilizando un cóctel de enriquecimiento de linfocitos T humanos RosetteSep™ (Stemcell Technologies, Francia, n.º de catálogo 15061) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se marcaron los linfocitos T con Celltrace Violet (Invitrogen, n.º de catálogo C34557A; concentración final 5 µM) durante 15 minutos a una temperatura de 37 °C. En paralelo, se marcaron células tumorales Karpas-299 con Celltrace FarRed (Invitrogen, n.º de catálogo C34564A; concentración final 2 µM) durante 15 minutos a una temperatura de 37 °C. Después del etiquetado, se añadió 5 veces el volumen de DBSI enfriado con hielo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron, se resuspendieron en medio y se sembraron las células tumorales en placas de 96 pocillos (Greiner-bio-one, Países Bajos, n.º de catálogo 655180) a una densidad de 50.000 células/pocillo. Se agregaron diluciones en serie de anticuerpos CD3xCD30 biespecíficos (la concentración final oscilaba entre 1.000 ng/ml y 0,051 ng/ml; diluciones triples) y se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron linfocitos T a las células tumorales en una relación entre efector y diana (E:T) de 4:1 y se incubaron las placas durante 72 horas a una temperatura de 37 °C. Después de lavar 2 veces con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % (tampón de tinción), se tiñeron las células para detectar marcadores de linfocitos T CD4 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 300521, conjugado con Pacific Blue), CD8 (1:100; BD Biosciences, conjugado con FITC) y marcadores de activación

de linfocitos T CD69 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 310934, conjugado con BV650), CD25 (1:100; Invitrogen, n.º de cat. 25-0259- 42, conjugado con PE-Cy7) y CD279/PD-1 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 329930, conjugado con BV605). Se incluyeron muestras teñidas individuales con perlas Ultracomp (5 µl; Invitrogen, n.º de catálogo 01-2222-42) y se utilizaron para ajustes de compensación del citómetro de flujo. Después de 30 minutos de incubación a una temperatura de 4 °C, se lavaron las placas dos veces con tampón de tinción y se tiñeron las células con 7-AAD (diluido 1:100 en tampón de tinción) durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Se analizaron las células utilizando un FACS Celesta (BD Biosciences). Los datos se procesaron utilizando FlowJo (BD Biosciences).

Se generaron curvas dosis-respuesta usando un análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

Las Figuras 13A y B muestran que todos los anticuerpos CD3xCD30 inducen la citotoxicidad mediada por linfocitos T de células Karpas-299. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 generados utilizando el clon CD30 MDX060 (bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR y bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR) fueron más eficaces para destruir las células Karpas-299 en comparación con todos los demás clones sometidos a prueba. De hecho, los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 basados en MDX060 mostraron valores de IC₅₀ significativamente más bajos en comparación con los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 generados utilizando clones CD30 HRS-3, HeFi-I, T105, T405, T408 o T215 (bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR y bsG1-huCD3-FEALxCD30 -T215-FEAR; Figura 13A). Además, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR y bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR indujeron una destrucción máxima mayor en comparación con los anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 generados usando clones CD30 hAC10, HeFi-I, T405, T408 o T215 (bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR, bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR y bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR; Figura 13B). Las Figuras 13C y D muestran que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR y bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR fueron más eficaces (valores de EC₅₀ más bajos) que cualquiera de los otros anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 para inducir la expresión de CD25, como medida de activación de linfocitos T en linfocitos T CD4⁺ (Figura 13C) o linfocitos T CD8⁺ (Figura 13D). Se observaron resultados similares para la expresión de PD-1 (Figura 13E y F) y CD69 (datos no mostrados). No se observaron diferencias en la destrucción mediada por linfocitos T ni en la activación de linfocitos T entre los dos anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 basados en MDX060 que contienen las mutaciones FEAR o FERR.

El anticuerpo biespecífico bsG1-huCD3xCD30-MX060 también fue más eficaz para

inducir citotoxicidad mediada por linfocitos T de células L-428 en comparación con otros anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 analizados (datos no mostrados).

La Tabla 9 resume las concentraciones promedio de IC₅₀ y el porcentaje máximo de lisis de citotoxicidad mediada por linfocitos T y las concentraciones de EC₅₀ de activación de linfocitos T (expresión de CD25) inducidas por el panel de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 usados en estos experimentos.

En conclusión, estos datos demostraron que bsG1huCD3xCD30-MDX060 fue más eficaz que cualquiera de los otros anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 evaluados para inducir citotoxicidad mediada por linfocitos T.

Tabla 9: Concentraciones de IC₅₀ y porcentaje máximo de lisis de citotoxicidad mediada por linfocitos T de células Karpas-299 y concentraciones de EC₅₀ de activación de linfocitos T (expresión de CD25) inducida por un panel de anticuerpos biespecíficos CD3xCD30

Anticuerpo	Citotoxicidad		Activación de linfocitos T (expresión de CD25)		Activación de linfocitos T (expresión de PD-1)	
			CD4+ Linfocitos T	CD8+ Linfocitos T	CD4+ Linfocitos T	CD8+ Linfocitos T
	IC ₅₀ (µg/ml)	Lisis máxima (%)	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)
	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-MDX060- FERR	0,029 (0,004)	52,328 (3,929)	0,023 (0,004)	0,020 (0,005)	0,025 (0,006)	0,023 (0,009)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-MDX060- FEAR	0,033 (0,004)	53,703 (5,949)	0,024 (0,004)	0,020 (0,005)	0,024 (0,006)	0,027 (0,009)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-hAC10- FEAR	0,032 (0,006)	37,765 (5,340)	0,046 (0,011)	0,054 (0,021)	0,056 (0,021)	0,057 (0,031)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-HRS-3- FEAR	0,068 (0,011)	47,472 (6,539)	0,089 (0,031)	0,079 (0,031)	0,123 (0,046)	0,112 (0,047)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-HeFi-I- FEAR	0,052 (0,011)	42,987 (6,603)	0,069 (0,013)	0,076 (0,016)	0,075 (0,024)	0,083 (0,023)
bsG1-huCD3-	0,042	52,582	0,056	0,060	0,064	0,065

Anticuerpo	Citotoxicidad		Activación de linfocitos T (expresión de CD25)		Activación de linfocitos T (expresión de PD-1)	
			CD4+ Linfocitos T	CD8+ Linfocitos T	CD4+ Linfocitos T	CD8+ Linfocitos T
	IC ₅₀ (µg/ml)	Lisis máxima (%)	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)
	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)	Promedio (SD)
FEALxCD30-T105- FEAR	(0,007)	(5,344)	(0,010)	(0,017)	(0,021)	(0,024)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-T405- FEAR	0,078 (0,023)	41,667 (4,560)	0,093 (0,027)	0,080 (0,056)	0,138 (0,054)	0,140 (0,126)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-T408- FEAR	0,226 (0,112)	41,295 (5,482)	0,172 (0,046)	0,134 (0,077)	0,286 (0,104)	0,220 (0,126)
bsG1-huCD3- FEALxCD30-T215- FEAR	0,077 (0,032)	42,840 (6,464)	0,092 (0,036)	0,105 (0,063)	0,355 (0,476)	0,281 (0,308)

Ejemplo 9 – Inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T, proliferación de linfocitos T y activación de linfocitos T *in vitro* mediante bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Se evaluó la citotoxicidad de las células tumorales mediada por linfocitos T y la proliferación y activación de linfocitos T asociadas mediante bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en líneas celulares HL y ALCL.

Se obtuvieron linfocitos T de capas leucocitarias de donantes humanos sanos (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) y se los analizó utilizando un cóctel de enriquecimiento de linfocitos T humanos RosetteSep™ (Stemcell Technologies, Francia, n.º de catálogo 15061) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se marcaron los linfocitos T con Celltrace Violet (Invitrogen, n.º de catálogo C34557A; concentración final 5 µM) durante 15 minutos a una temperatura de 37 °C. En paralelo, se marcaron las células tumorales L-428, KI-JK, KM-H2 o SUP-M2 con Celltrace FarRed (Invitrogen, n.º de catálogo C34564A; concentración final 2 µM) durante 15 minutos a una temperatura de 37 °C. Después del etiquetado, se añadió 5 veces el volumen de DBSI enfriado con hielo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron, se resuspendieron en medio y se sembraron las células tumorales en placas de 96 pocillos (Greiner-bio-one, Países Bajos, n.º de catálogo 655180) a una densidad de 50.000 células/pocillo. Se añadieron diluciones seriadas de bsG1-

huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR o anticuerpos de control IgG1-huCD3-FEAL, bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-b12-FEAL (a una concentración final que oscila entre 1.000 ng/ml y 0,051 ng/ml; diluciones triples) y se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron linfocitos T a las células tumorales en una relación entre efector y diana (E:T) de 4:1 y se incubaron las placas durante 72 horas a una temperatura de 37 °C. Después de lavar 2 veces con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % (tampón de tinción), se tiñeron las células para detectar marcadores de linfocitos T CD4 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 300521, conjugado con Pacific Blue), CD8 (1:100; BD Biosciences, n.º de cat. 345772, conjugado con FITC) y marcadores de activación de linfocitos T CD69 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 310934, conjugado con BV650), CD25 (1:100; Invitrogen, n.º de cat. 25-0259-42, conjugado con PE-Cy7) y CD279/PD-1 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 329930, conjugado con BV605). Se incluyeron muestras teñidas individuales con perlas Ultracomp (5 µl; Invitrogen, n.º de catálogo 01-2222-42) y se utilizaron para ajustes de compensación del citómetro de flujo. Después de 30 minutos de incubación a una temperatura de 4 °C, se lavaron las placas dos veces con tampón de tinción y se tiñeron las células con 7-AAD (diluido 1:100 en tampón de tinción) durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Se analizaron las células con un FACS Celesta (BD Biosciences) y se procesaron los datos con FlowJo (BD Biosciences).

Se calculó el porcentaje de células diana vivas mediante la siguiente ecuación: - % de células diana vivas = (número absoluto de células vivas etiquetadas individualmente con Celltrace FarRed en cada condición/número absoluto de células vivas etiquetadas individualmente con Celltrace FarRed en la condición que contenía sólo células diana y linfocitos T sin añadir ningún anticuerpo) x 100.

Se evaluó la proliferación de linfocitos T seleccionando los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ con tinción Celltrace Violet diluida. Se calculó el índice de expansión utilizando la herramienta de modelado de proliferación de FlowJo. Se ajustaron los valores máximos de generación en forma automática y se calcularon los valores del índice de expansión de acuerdo con la siguiente ecuación:

Índice de expansión = Cantidad total de células/cantidad de células al inicio del cultivo = (G0 + G1 + G2 + G3 + G4 + G5 + G6)/(G0 + G1:2 + G2:4 + G3:8 + G4:16 + G5:32 + G6:64).

Gn = número de células en el valor máximo de generación n (con n = de 0 a 6).

Se generaron curvas dosis-respuesta usando un análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

La Figura 14 muestra que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR indujo citotoxicidad mediada por linfocitos T dependiente de la dosis en líneas celulares L-428 (HL), KM-H2 (HL),

SUP-M2 (ALCL) y KI-JK (ALCL) *in vitro*. La Tabla 10 resume las concentraciones promedio de IC₅₀ de citotoxicidad mediada por linfocitos T inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en células L-428 y KI-JK. No se observó citotoxicidad en células incubadas con anticuerpos de control IgG1-huCD3-FEAL, bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-b12-FEAL ni en muestras incubadas sin anticuerpos.

Las Figuras 15, 16, 17 y 18 muestran que la citotoxicidad mediada por linfocitos T de células L-428 y KI-JK inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR se asoció con la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 15) y la expresión de los marcadores de activación de linfocitos T CD69 (Figura 16), CD25 (Figura 17) y PD-1 (Figura 18). La Tabla 10 resume las concentraciones promedio de EC₅₀ de proliferación y activación de linfocitos T inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en estos experimentos.

Por lo tanto, bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR indujo citotoxicidad mediada por linfocitos T dependiente de la dosis en líneas celulares HL y ALCL *in vitro*, que se asoció con la proliferación y activación de linfocitos T.

Tabla 10: Concentraciones de EC₅₀ de citotoxicidad mediada por linfocitos T inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en células L-428 y KI-JK y proliferación de linfocitos T asociada y activación de células CD4⁺ y CD8⁺

Línea celular tumoral		L-428		KI-JK	
Citotoxicidad					
	IC ₅₀ promedio (µg/ml)	0,002		0,0015	
	Intervalo de IC ₅₀ (µg/ml)	0,001216 - 0,003439		0,0008858 - 0,001904	
Tipo de linfocitos T		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Proliferación de linfocitos T					
PI	EC ₅₀ promedio (µg/ml)	0,0051	0,00096	0,00606	0,00213
	Intervalo de EC ₅₀ (µg/ml)	0,003727 - 0,006534	0,0002052 - 0,002255	0,00338 - 0,007501	0,001103 - 0,002715
Activación de linfocitos T					
CD69	EC ₅₀ promedio de CD69 (µg/ml)	0,00083	0,00121	0,00146	0,00171
	Intervalo de EC ₅₀ de CD69 (µg/ml)	0,0001221 - 0,001647	3,252E-14 - 0,002421	0,0004487 - 0,002086	4,694E-11 - 0,005097
CD25	EC ₅₀ promedio de	0,00261	0,00061	0,00599	0,00656

Línea celular tumoral		L-428		KI-JK	
	CD25 (µg/ml)				
	Intervalo de EC ₅₀ de CD25 (µg/ml)	0,002164 - 0,002898	0,000298 - 0,001006	0,004483 - 0,007791	0,001901 - 0,01562
PD-1	EC ₅₀ promedio de PD-1 (µg/ml)	0,00491	0,00257	0,0112	0,00696
	Intervalo de EC ₅₀ de PD-1 (µg/ml)	0,004387 - 0,005433	0,001302 - 0,003412	0,009616 - 0,01222	0,005845 - 0,009151
N pruebas		3		3	

Ejemplo 10 - Inducción de la producción de citocinas *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Se evaluó la producción de citocinas y granzima B inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en sobrenadantes que se recogieron durante un experimento de citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* utilizando células diana L-428 y linfocitos T de donantes sanos, tal como se describe en el Ejemplo 9. Se almacenaron los sobrenadantes a una temperatura de -20 °C y se los descongeló para su análisis. Se midió la concentración de 14 citocinas diferentes (CD40, IFN γ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, PDL-1, TNF α) y Granzima B utilizando un inmunoensayo múltiplex basado en perlas (luminex) hecho a medida por sistemas de investigación y desarrollo.

Resultados

Se observaron concentraciones aumentadas principalmente de granzima B y citocinas IFN γ , IL-13 y TNF α (>2000 pg/ml) en sobrenadantes de cocultivos de células L-428 y linfocitos T en presencia de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. Se observó un aumento moderado en las concentraciones de citocinas CD40, IL-10, IL-12, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL6 e IP-10, en comparación con el anticuerpo de control IgG1-b12-FEAL. No se modularon los niveles de IL-8, MCP-1 y PDL1 en comparación con el anticuerpo de control IgG1-b12-FEAL (Figura 19).

Por lo tanto, la citotoxicidad mediada por linfocitos T y la activación de linfocitos T por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR se asoció con la producción dependiente de la dosis de citocinas y granzima B.

Ejemplo 11 - Inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR usando linfocitos T purificados como células efectoras en relaciones variables entre efector y diana

Para determinar la relación óptima entre células efectoras y diana de la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T en presencia del anticuerpo biespecífico bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando la

línea celular tumoral CD30 positiva L-428 como células diana y linfocitos T purificados como células efectoras en relaciones variables entre efector y célula diana (E:T).

Se evaluó la citotoxicidad mediada por linfocitos T esencialmente como se describe en el Ejemplo 9, excepto que se añadieron linfocitos T a las células tumorales en relaciones variables entre células efectoras y diana (E:T) de 1:1, 2:1, 4:1 u 8: 1.

Resultados

La Figura 20A muestra que la citotoxicidad mediada por linfocitos T dependiente de la dosis fue inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en todas las relaciones E:T, observándose la destrucción máxima de células tumorales (menos del 20 % de células tumorales viables) en relaciones E:T de 4:1 y 8:1. En línea con esto, se observó una proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en todas las relaciones de células E:T, de forma más significativa en relaciones E:T de 4:1 y 8:1 (Figura 20B-C). El anticuerpo control bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR no indujo citotoxicidad específica mediada por linfocitos T ni proliferación de linfocitos T en ninguna de las relaciones E:T analizadas.

En conjunto, estos datos indican que la citotoxicidad mediada por linfocitos T inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR de células tumorales L-428 *in vitro* fue la de máxima eficacia en relaciones E:T de 4:1 y 8:1.

Ejemplo 12 - Cinética de citotoxicidad mediada por linfocitos T y proliferación de linfocitos T *in vitro* por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Para evaluar la cinética de la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T en presencia de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en diferentes períodos de incubación utilizando la línea celular tumoral CD30 positiva L-428 como células diana y linfocitos T purificados como células efectoras.

La citotoxicidad mediada por linfocitos T se evaluó esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 9, excepto que la citotoxicidad de las células tumorales y la proliferación de linfocitos T se evaluaron después de 24, 48 y 72 horas.

Resultados

La Figura 21 muestra que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR indujo citotoxicidad mediada por linfocitos T dependiente de la dosis después de 48 horas y 72 horas, mientras que no se observó citotoxicidad mediada por linfocitos T significativa después de 24 horas. La proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ dependiente de la dosis fue inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR después de 72 horas, mientras que no se observó proliferación de linfocitos T después de 24 horas o 48 horas (Figuras 21B y C).

En conjunto, estos datos muestran que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR indujo la citotoxicidad de las células tumorales mediada por linfocitos T y la proliferación de linfocitos T de una manera dependiente del tiempo.

Ejemplo 13 - Correlación del nivel de expresión de CD30 con citotoxicidad *in vitro* mediada por linfocitos T inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Se determinó la destrucción mediada por linfocitos T a través de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR de ocho líneas celulares tumorales que expresan CD30 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* tal como se describe en el Ejemplo 9, usando una relación E:T de 4:1. Se utilizaron las siguientes líneas celulares: L-428, KM-H2, DEL, KI-JK, KARPAS-299, SUP-M2, NCEB-1 y JVM-2. Para estas líneas de células tumorales, se evaluaron los niveles de expresión de CD30 mediante citometría de flujo cuantitativa como se detalla en el Ejemplo 2.

Resultados

La Figura 22 muestra que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR indujo citotoxicidad mediada por linfocitos T en todas las líneas celulares *in vitro* con una destrucción máxima de células diana entre 68 % y 98 %. La destrucción máxima de células tumorales mediada por linfocitos T mediante bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR se correlacionó significativamente con el nivel de expresión de CD30 (Figura 22A).

En la Figura 22B, la EC₅₀ de la destrucción mediada por linfocitos T en presencia de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR para cada línea celular se representa gráficamente frente a los niveles de expresión de CD30, mostrando una tendencia negativa, pero no significativa.

Por lo tanto, estos datos muestran una correlación positiva entre los niveles de expresión de CD30 y la citotoxicidad máxima mediada por linfocitos T *in vitro* inducida por bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR.

Ejemplo 14 - Fratricidio de linfocitos T activados por BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Se evaluó *in vitro* el fratricidio de linfocitos T inducido por BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR de linfocitos T CD30⁺ activados.

Se recubrió una placa de 96 pocillos (Greiner-bio-one, Países Bajos, n.º de cat. 655180) con 100 µl de una solución de 1 µg/ml de CD3 antihumano (clon OKT3, Invitrogen, n.º de cat. 16- 0037-85) en PBS. Se incubó la placa durante 4 horas a una temperatura de 37 °C. Después de retirar la solución de anticuerpos, se lavaron los pocillos con 100 µl de PBS. Los linfocitos T se obtuvieron de capas leucocitarias de donantes humanos sanos (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) y se los aisló utilizando un cóctel de enriquecimiento de linfocitos T humanos RosetteSep™ (Stemcell Technologies, Francia, n.º de catálogo 15061) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se resuspendieron los linfocitos T purificados en medio de linfocitos T (medio [RPMI]-1640 del Roswell Park Memorial Institute con HEPES 25 mM y L-glutamina (Lonza, n.º de cat. BE12-115F), complementado con 10 % de suero

bovino donante inactivado por calor, con hierro (DBSI; Gibco, n.º cat. 20731-030) y se añadió penicilina/estreptomicina (pen/strep; Lonza, n.º de cat. DE17-603E) a una concentración de 2×10^6 células/ml 100 µl de suspensión de linfocitos T (que contiene 200.000 linfocitos T) a cada pocillo de la placa recubierta con anti-CD3. Además, se agregaron 100 µl de medio de cultivo de linfocitos T complementado con 2 µg/ml de anti-CD28 (clon CD28.2, Invitrogen, n.º de cat. 16-0289-85) y 0,05 µg/ml de IL-15 (ThermoFisher, n.º de cat. PHC9151) a cada pocillo. Luego, se incubaron los linfocitos T durante 96 horas a una temperatura de 37 °C.

Después de 96 horas, se recogieron los linfocitos T y se los resuspendió en medio de linfocitos T a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se realizó un análisis de citometría de flujo para medir la expresión de CD30 y marcadores de activación de linfocitos T. En resumen, se lavó una alícuota de células con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % (tampón de tinción), se tiñó con 50 µl de colorante de viabilidad FVS510 diluido 1000x (BD Biosciences, n.º de cat. 564406) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, se lavaron las células con tampón de tinción y se las tiñó para CD30 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 333906, conjugado con PE), marcadores de linfocitos T CD4 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 300506, conjugado a FITC), CD8 (1:100; Biolegend, n.º de cat. 301028, conjugado con AF700) y marcadores de activación de linfocitos T CD69 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 310910, conjugado con APC), CD25 (1:100; Invitrogen, n.º de catálogo 25-0259-42, conjugado con PE-Cy7) y CD279/PD1 (1:50; Biolegend, n.º de catálogo 329924, conjugado con BV605). Se incluyeron muestras teñidas individuales con perlas Ultracomp (5 µl; Invitrogen, n.º de catálogo 01-2222-42) y se utilizaron para ajustes de compensación del citómetro de flujo. Después de 30 minutos de incubación a una temperatura de 4 °C, se lavaron las placas dos veces con tampón de tinción. Se analizaron las células utilizando un FACS Celesta (BD Biosciences) y se procesaron los datos utilizando FlowJo (BD Biosciences).

Para evaluar si BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR puede inducir un fratricidio de linfocitos T activados, se sembraron linfocitos T estimulados en una placa de 96 pocillos a una densidad de 200.000 células/pocillo. Luego, se agregaron a cada pocillo 50 µl de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, o anticuerpos control, es decir, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxb12-MDX060-FERR o IgG1-b12 (a una concentración final que oscila entre 0,003 µg/ml y 3,3 µg/ml en pasos de dilución triple en medio de linfocitos T). Se incubaron las placas a una temperatura de 37 °C durante 48 horas.

Después de lavar 2 veces con tampón de tinción, se tiñeron las células con colorante de viabilidad FVS510 y, en consecuencia, se las tiñó para detectar los marcadores de linfocitos T CD4 y CD8 y los marcadores de activación de linfocitos T CD69, CD25 y CD279/PD1. El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo con un FACS Celesta (BD Biosciences) y se procesaron los datos con FlowJo (BD Biosciences).

Se generaron las curvas dosis-respuesta utilizando el software GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

La Figura 23 muestra que los marcadores celulares CD25 (activación de linfocitos T) (A) y CD30 (B) se expresaron en 54-63 % y 21-27 % de linfocitos T respectivamente después de 72 horas de incubación. Se indujo la expresión de CD25 y CD30 en forma adicional después de 96 horas de incubación (CD25: 80-83 % y CD30: 27-33 %). La Figura 23C muestra que dosis crecientes de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR, bsG1-huCD3-FEALxb12-MDX060-FERR o IgG1-b12 no se asociaron con una viabilidad reducida de los linfocitos T activados.

Por lo tanto, la expresión de CD30 en una subpoblación de linfocitos T activados no resultó en fratricidio de linfocitos T después de la incubación con BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR.

Ejemplo 15 - Interferencia de sCD30 con la actividad antitumoral de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Se evaluó la eliminación de CD30 de la superficie celular y la generación de CD30 soluble (sCD30) en 17 líneas celulares tumorales CD30⁺ hematológicas diferentes.

Se midió la concentración de sCD30 en 25 µl de sobrenadante sin diluir recolectado de cultivos celulares tres días después de sembrar las células en el medio fresco mediante un ensayo ELISA para la detección cuantitativa de CD30 humano, usando el "Kit ELISA sCD30 humano" (Invitrogen, n.º de cat. BMS240), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

La Figura 24A muestra la concentración de sCD30 en el sobrenadante del cultivo celular. Tal como se muestra, se detectaron concentraciones variables de sCD30 en los sobrenadantes de cultivos celulares de diferentes líneas celulares. La Figura 24B muestra que la concentración de sCD30 en los sobrenadantes del cultivo celular se correlacionaba significativamente con los niveles de expresión de membrana de CD30, medidos mediante citometría de flujo cuantitativa tal como se describió más arriba en el Ejemplo 2 (kit de calibrador de IgG humana, Biopathyx, n.º de catálogo CP010).

Para evaluar si sCD30 puede bloquear la potente citotoxicidad mediada por linfocitos T inducida por BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, se evaluó la citotoxicidad mediada por linfocitos T por BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en células tumorales DEL (ALCL), que mostró niveles elevados de sCD30 en el sobrenadante (129 ng/ml). Se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad mediada por linfocitos T tal como se describió más arriba (Ejemplo 8). La Figura 24C muestra que BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR indujo una potente citotoxicidad mediada por linfocitos T en esta línea celular, con una destrucción máxima de células tumorales del 86 % lo que indica que BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR seguía siendo capaz de inducir una potente citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* en presencia de sCD30.

Por lo tanto, las concentraciones de sCD30 variaron entre los tipos de células y se correlacionaron con el nivel de expresión de CD30 en la superficie celular. Además, BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR aún pudo inducir una potente citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* en presencia de sCD30.

Ejemplo 16 – Citotoxicidad *ex vivo* de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR usando linfocitos T mononucleares de sangre periférica derivados de pacientes, como células efectoras

Se sometieron a prueba anticuerpos biespecíficos CD3xCD30 en un ensayo de citotoxicidad *ex vivo* utilizando una línea celular tumoral positiva para CD30 como células diana y linfocitos T primarios derivados del paciente como células efectoras. Como fuente de linfocitos T, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, Discovery Life Sciences, Tabla 11) derivadas de pacientes con linfoma de Hodgkin (HL), linfoma no Hodgkin (NHL) y leucemia mieloide aguda (AML) para evaluar la destrucción de células tumorales dependientes de CD3.

Se marcaron las células tumorales L-428 con Celltrace FarRed (Invitrogen, n.º de catálogo C34564A; a una concentración final de 2 µM) durante 15 minutos a una temperatura de 37 °C. Después del etiquetado, se incubó 5 veces el volumen de DBSI enfriado con hielo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron, se resuspendieron en medio y se sembraron las células tumorales en placas de 96 pocillos (Greiner-bio-one, Países Bajos, n.º de catálogo 655180) a una densidad de 50.000 células/pocillo. Se agregaron diluciones en serie de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR y el anticuerpo de control IgG1-b12-FEAL (la concentración final oscilaba entre 1000 ng/ml y 0,051 ng/ml; diluciones triples) y se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se descongelaron las PBMC, se hizo un recuento y se las resuspendió en medio (RPMI1640/10 % FBS/1 % penicilina-estreptomicina/1 % glutamato), antes de agregarlas a las células tumorales en una relación entre efector-diana (E:T) de 8:1 y se incubaron las placas durante 72 horas a una temperatura de 37 °C. Después de lavar 2 veces con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % (tampón de tinción), se tiñeron las células para detectar diferentes poblaciones de células utilizando CD3 (linfocitos T; Invitrogen, n.º de catálogo 48-0037), CD14 (monocitos/macrófagos; Biolegend; n.º de cat. 301834), CD19 (linfocitos B; Biolegend; n.º de cat. 302246), CD16 (monocitos/macrófagos; BD Biosciences; n.º de cat. 556618), CD56 (células NK; BD Biosciences; n.º de cat. 564849) y CD66b (granulocitos; Biolegend; n.º de cat. 305116). Se tiñeron las células en forma adicional para detectar los marcadores de linfocitos T CD4 (1:50; Biolegend, n.º de catálogo 300521, conjugado con Pacific Blue), CD8 (1:100; BD Biosciences, n.º de catálogo 345772, conjugado con FITC) y marcadores de activación de linfocitos T CD69 (1:50; Biolegend, n.º de cat. 310934, conjugado con BV650), CD25 (1:100; Invitrogen, n.º de cat. 25-0259-42, conjugado con PE-Cy7) y CD279/PD1 (1:50; Biolegend, n.º de catálogo 329930, conjugado con BV605). Se incluyeron muestras

teñidas individuales con perlas Ultracomp (5 µl; Invitrogen, n.º de catálogo 01-2222-42) y se utilizaron para ajustes de compensación del citómetro de flujo. Después de 30 minutos de incubación a una temperatura de 4 °C, se lavaron las placas dos veces con tampón de tinción y se tiñeron las células con 7-AAD (diluido 1:100 en tampón de tinción) durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Se analizaron las células con un FACS Celesta (BD Biosciences) y se procesaron los datos con FlowJo (BD Biosciences). Se generaron curvas dosis-respuesta usando un análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Se calculó el porcentaje de células diana vivas mediante la siguiente ecuación:- % de células diana vivas = (número absoluto de células vivas etiquetadas individualmente con Celltrace FarRed en cada condición/número absoluto de células vivas etiquetadas individualmente con Celltrace FarRed en la condición que contiene sólo células diana y linfocitos T sin añadir ningún anticuerpo) x 100.

Resultados

La Figura 25A muestra que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR indujo citotoxicidad dependiente de la dosis de células tumorales L-428 después de 72 horas, mediada por linfocitos T derivados tanto de un donante de control sano como de diferentes donantes de pacientes con HL y NHL. La citotoxicidad se asoció con la activación y proliferación de linfocitos T, ilustrada por la regulación positiva de CD69, CD25 y PD-1 (Figuras 25 B-D). No se observó citotoxicidad mediada por linfocitos T para el anticuerpo de control IgG1-b12-FEAL. No se observó citotoxicidad mediada por linfocitos T de las células tumorales L-428 para el donante E (AML), lo que podría atribuirse a la baja frecuencia de linfocitos T dentro de la muestra de PBMC (Tabla 11).

En conjunto, estos datos ilustran que los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con HL y LNH son capaces de inducir citotoxicidad mediada por linfocitos T de líneas celulares tumorales en presencia de bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR.

Tabla 11. Características de la muestra de PBMC del paciente primario

N.º de muestra	Código	Origen	Estado de tratamiento (Tx)	Empresa	Viabilidad celular (%)	Frecuencia de linfocitos T (%)
A	100000537	Hodgkin, linfoma de Hodgkin con esclerosis nodular	Etapas IV, pre-Tx	Discovery Life Sciences	63,5	71,1

N.º de muestra	Código	Origen	Estado de tratamiento (Tx)	Empresa	Viabilidad celular (%)	Frecuencia de linfocitos T (%)
B	120328910	Linfoma de Hodgkin	pre-Tx		81,7	56,1
C	17A0D69A3	Hodgkin, linfoma de Hodgkin de celularidad mixta	pre-Tx		87,5	35,6
D	D4931CBAB	Hodgkin, linfoma de Hodgkin con predominio linfocítico nodular	Etapa II-A, pre-Tx, CD20+		63,95	59,9
E	200003963	Leucemia mieloide aguda (AML)	Tx activo, con prueba de EBV		65,55	17,4
F	121426858	NHL, linfoma periférico de linfocitos T (PTCL) - sin especificar	Etapa III, post-Tx, tratamiento CHP+Adcetris/Adriamicina		66,2	68
HC	--	PBMC de control sanas	N.A.	Sanquin	86,55	48,4

Ejemplo 17 - Evaluación de propiedades farmacocinéticas de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR en ratones SCID

Se inyectaron por vía intravenosa (IV) ratones SCID hembras libres de tumores de 11-12 semanas de edad (ratones C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdcscid, Envigo) con una monodosis de 1 µg (0,05 mg/ kg) 10 µg (0,5 mg/kg) o 100 µg (5 mg/kg) de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR. Se estableció el experimento para estudiar la eliminación de anticuerpos en ausencia de eliminación mediada por la diana, ya que BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-

FERR no presenta reacciones cruzadas con proteínas de ratón.

Se recogieron 40 µl de muestras de sangre de la punción de la vena de la mejilla o de la vena safena a los 10 minutos, 4-6 horas, 24 horas, 2 días, 7 días, 14 días y 21 días después de la administración del anticuerpo. La sangre se recogió en ampollas que contenían K2-EDTA (Sarstedt, Microvette CB300, n.º de catálogo 16.444.100) y se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 g. Se transfirieron los sobrenadantes de plasma a ampollas Eppendorf etiquetadas y se las almacenó a una temperatura de -80 °C hasta la determinación de la concentración de IgG en plasma.

Se determinaron las concentraciones de IgG humana mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de IgG humana total. Se usó un clon MH16 de IgG-kappa antihumano de ratón (CLB Sanquin, Países Bajos; n.º de cat. M1268), recubierto con 100 µl de PBS (BioTrading, n.º de cat. K654F500PP) durante la noche a una temperatura de 4 °C en placas Microlon ELISA de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/ml, como anticuerpo de captura. Después de bloquear las placas con PBSA (PBS con albúmina sérica bovina [BSA] al 0,2 %) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), se agregaron muestras, se las diluyó en serie en PBSA y se las incubó en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con 300 µl de PBST (PBS complementado con Tween 20 al 0,05 %) y luego, se las incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con inmunoglobulina IgG antihumana de cabra (Jackson, West Grace, PA; n.º de catálogo 109-035-098); 1:10.000 en PBST complementado con 0,2 % BSA). Se lavaron las placas tres veces con 300 µl de PBST antes de la incubación con ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS; Roche, n.º de catálogo 11112422001 y 11112597001) protegidas de la luz. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de ácido oxálico al 2 % (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 33506), y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas de absorbancia ELx808 (Biotek, Winooski, VT).

A partir del anticuerpo de referencia IgG1λ humano (proteína pura 30C, n.º de catálogo BP078) se generó una curva estándar (intervalo de concentración: 1 mg/ml [3 µl]) para diluirla adicionalmente en diluciones triples en PBSTA. Se usó el material inyectado para generar una segunda curva estándar y se preparó a partir de la dosis de 5 mg/kg con una concentración de 1 mg/ml (3,6 µl de anticuerpo) para diluirlo aún más en diluciones triples en PBSTA.

Resultados

A partir de los estándares de referencia, se calculó una curva de calibración mediante interpolación de incógnitas utilizando una curva de ajuste logístico de 4 parámetros en Excel de Microsoft. Se calcularon las concentraciones de IgG1 humana en las muestras de plasma a partir de la ecuación de la curva de calibración, se las representó (Figura 26A) y se calculó el área bajo la curva (AUC) utilizando el software GraphPad Prism. Se determinó la eliminación

de IgG hasta el último día de muestreo de sangre (día 21) mediante la fórmula $D \cdot 1.000 / AUC$, en la que D es la dosis de inyección (1 mg/kg) (Figura 26B).

BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR no reacciona en forma cruzada con proteínas de ratón y, por lo tanto, se esperaba que las propiedades farmacocinéticas fueran comparables a otras moléculas de IgG1 humanas de tipo salvaje sin unión. Se calculó que la concentración plasmática de IgG humana esperada para todos los grupos de dosis era de alrededor de 100 µg/ml (~5 mg/kg), 10 µg/ml (~0,5 mg/kg) o 1 µg/ml (~0,05 mg/kg). En todos los puntos de tiempo, las muestras de animales tratadas con 0,05 mg/kg no fueron mensurables.

La tasa de eliminación plasmática de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR fue comparable a la tasa de eliminación plasmática prevista de la IgG1 humana normal. La concentración plasmática máxima media de IgG humana (C_{max}) fue comparable a la C_{max} prevista de IgG1 humana normal.

Por lo tanto, el perfil farmacocinético de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR es comparable con el previsto para la IgG1 humana normal en ratones SCID no portadores de tumores en ausencia de unión a la diana.

Ejemplo 18 - Evaluación de la unión de C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR

Se evaluó la unión de la proteína del complemento C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR unida a la membrana, o los anticuerpos parentales a partir de los cuales se generó BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, es decir, IgG1-huCD3-FEAL e IgG1-CD30-MDX060-FERR, utilizando células que expresan CD3 o CD30.

A. Unión de C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR unida a células que expresan CD3

Se sometió a prueba la unión de la proteína del complemento C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR e IgG1-huCD3-FEAL unidas a CD3 utilizando linfocitos T CD8⁺ humanos estimulados. Se incluyó IgG1-CD52-E430G como control positivo, que tiene dominios VH y VL basados en el anticuerpo CD52 CAMPATH-1H y tiene una estructura principal mejorada con Fc que se sabe que se une de forma eficaz a C1q cuando se une a la superficie celular. Como anticuerpos de control negativo sin unión, se incluyeron IgG1-b12-FERR e IgG1-b12.

Se purificaron (enriquecieron) los linfocitos T CD8⁺ humanos a partir de capas leucocitarias obtenidas de voluntarios sanos (Sanquin) mediante selección negativa utilizando el cóctel de enriquecimiento de linfocitos T CD8⁺ humanos RosetteSep™ (Stemcell Technologies, n.º de catálogo 15023C.2) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se resuspendieron los linfocitos T purificados en medio para linfocitos T (medio [RPMI]-1640 del Roswell Park Memorial Institute con 25 mM de HEPES y L-glutamina (Lonza, n.º de cat. BE12-

115F), complementado con un 10 % de suero bovino donante inactivado por calor, con hierro (DBSI; Gibco, n.º de cat. 20731-030) y penicilina/estreptomicina (pen/strep; Lonza, n.º de cat. DE17-603E).

Se lavaron las microesferas anti-CD3/CD28 (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28; ThermoFisher Scientific, n.º de cat. 11132D) con PBS y se las resuspendió en medio de linfocitos T. Se añadieron las perlas a los linfocitos T CD8⁺ humanos enriquecidos en una relación de 1:1 y se las incubó a una temperatura de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas. Luego, se retiraron las perlas utilizando un imán, se lavaron las células dos veces en PBS y se contaron nuevamente.

Se confirmó la unión de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR e IgG1-huCD3-FEAL a los linfocitos T CD8⁺ activados mediante citometría de flujo, utilizando BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR e IgG1-huCD3-FEAL (30 µg/ml), e IgG F(ab')₂ antihumana de cabra conjugada con R-ficoeritrina (PE) (diluida 1:200 en tampón GMB FACS; Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-116-098).

Se sembraron linfocitos T CD8⁺ activados en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (30.000 células/pocillo), se sedimentaron y se resuspendieron en 30 µl de medio de ensayo (RPMI-1640 con HEPES 25 mM y L-glutamina, complementado con 0,1 % [p/vol] de fracción V de albúmina sérica bovina (BSA; Roche, n.º de cat. 10735086001) y penicilina/estreptomicina). Luego, se agregaron 50 µl de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-huCD3-FEAL, IgG1-b12-FERR, IgG1-CD52-E430G o IgG1-b12 (a concentraciones finales de $1,7 \times 10^{-4}$ – 30 µg/ml en pasos de dilución triple en medio de ensayo) a cada uno de los pocillos y se incubó a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos para permitir que los anticuerpos se unieran a las células.

Se añadió suero humano (20 µl/pocillo; Sanquin, lote 20L15-02), como fuente de C1q, hasta una concentración final del 20 %. Se incubaron las células en hielo durante 45 minutos, seguido de dos lavados con tampón GMB FACS frío e incubación con 50 µl de C1q antihumano de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (a una concentración final de 20 µg/ml (DAKO, n.º de cat. F0254); diluido 1:75 en tampón GMB FACS) en presencia o ausencia de anti-CD8 de ratón conjugado con alofocianina (BD Biosciences, n.º de cat. 555369; diluido 1:50 en tampón GMB FACS) en la oscuridad, a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Se lavaron las células dos veces con tampón GMB FACS frío, se las resuspendió en 20 µl de tampón GMB FACS complementado con ácido etilendiamino-tetraacético 2 mM (EDTA; Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 03690) y tinte de viabilidad 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:5.000; BD Pharmingen, n.º de cat. 564907). Se analizó la unión de C1q a células viables (identificadas mediante exclusión de DAPI) a través de citometría de flujo en un aparato iQue3 Screener (Intellicyt Corporation). Se analizaron los datos utilizando el software iQue (Intellicyt Corporation, ForeCyt® Enterprise Client Edition 6.2 [R3], versión 6.2.652). Se analizaron las curvas de unión mediante análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad

Prism.

Resultados

La Figura 27A muestra que, mientras que se observó una unión de C1q dependiente de la dosis a IgG1-CD52-E430G unida a la membrana, no se observó unión de C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR o IgG1-huCD3-FEAL unidas a la membrana, ni a los anticuerpos de control sin unión.

B. Unión de C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR unido a células que expresan CD30

Se sometió a prueba la unión de la proteína del complemento C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR e IgG1-huCD30-MDX060-FERR unidas a CD30 utilizando células de linfoma de células del manto NCEB-1. Como control positivo se incluyó IgG1-7D8-E430G (anti-CD20), que no contiene las mutaciones de inercia y conserva la capacidad de unión a C1q. Como anticuerpos de control negativo sin unión, se incluyó IgG1-b12-FERR.

Se suspendieron células NCEB-1 a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio de ensayo (RPMI-1640 (Lonza, Suiza, n.º de cat. BE12-115F) que contenía albúmina sérica bovina al 0,1 % (BSA, fracción V, Roche, n.º de cat. 10735086001) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco, n.º de cat. 15140-122). Se agregaron células tumorales (100.000 células en 50 µl) a placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner Bio, n.º de catálogo 650180). Luego, se agregaron 30 µl de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR, IgG1-CD30-MDX060-FERR o anticuerpos de control (a concentraciones finales de $5,6 \times 10^{-5}$ – 10 µg/ml en pasos de dilución triple diluidos en medio de ensayo) a cada uno de los pocillos y se incubó a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos para permitir que los anticuerpos se unan a las células.

Se sembró la mitad de las células (40 µl de suspensión celular que contenía anticuerpos) en una placa diferente para comprobar la unión del anticuerpo. Se confirmó la unión de BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR e IgG1-CD30-MDX060-FERR a células NCEB-1 mediante citometría de flujo, utilizando IgG F(ab')₂ antihumana de cabra conjugada con R-ficoeritrina (PE) (diluido 1:500 en tampón FACS; Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-116-098).

Se añadió suero humano (10 µl/pocillo; Sanquin, lote 21K04-01) a los 40 µl restantes de suspensión celular (20 % de la concentración final) y se incubó en hielo durante 45 minutos, seguido de lavado con tampón FACS e incubación con 25 µl de anticuerpos anti-C1q de conejo conjugados con FITC (a una concentración final de 20 µg/ml (DAKO, n.º de catálogo F0254); diluidos en tampón FACS) en la oscuridad, a una temperatura de 4 °C durante 30 minutos. Se lavaron las células con tampón FACS frío, se las resuspendió en 30 µl de tampón FACS complementado con tinción de viabilidad TO-PRO™-3 (1:5000; ThermoFisher, n.º de catálogo T3605) y se midió en el aparato iQue3 Screener (Intellicyt Corporation). Se

analizaron los datos utilizando el software iQue (Intellicyt Corporation, ForeCyt® Enterprise Client Edition 6.2 [R3], versión 6.2.652). Se analizaron las curvas de unión mediante análisis de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoideal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism.

Resultados

La Figura 27B muestra que si bien se observó unión de C1q dependiente de la dosis a IgG1-CD20-E430G unida a la membrana, no se observó unión de C1q a BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR o IgG1-CD30-MDX060-FERR unida a la membrana, o a los anticuerpos de control sin unión.

Por lo tanto, estos resultados demostraron que bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR no se une a C1q, lo que confirma la estructura funcionalmente inerte.