

ANTICUERPOS TRIESPECÍFICOS CD3/BCMA/CD38

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con nuevas
inmunoglobulinas heterodiméricas triespecíficas. Más
específicamente, la presente invención se relaciona con
inmunoglobulinas heterodiméricas triespecíficas que se
dirigen a un epítipo del antígeno CD3 humano, un epítipo
10 de BCMA humano y un epítipo del antígeno CD38 humano. La
presente invención también se relaciona con esta nueva
clase de inmunoglobulinas heterodiméricas triespecíficas
para uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas
y en particular cánceres tales como el cáncer
15 hematológico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En las últimas décadas se han desarrollado
20 anticuerpos multiespecíficos que se dirigen a una o más
moléculas relacionadas con el sistema inmunitario y a uno
o más antígenos tumorales para reclutar células
inmunitarias, como las células T, hacia las células
tumorales, para la inmunoterapia contra el cáncer. Por
25 ejemplo, los anticuerpos biespecíficos para CD3 en
células T y para un antígeno de superficie diana en

células cancerosas son capaces de conectar una célula T a una célula cancerosa, independientemente de la especificidad del receptor de células T, la coestimulación o la presentación del antígeno peptídico (WO2020204708A1). Los anticuerpos triespecíficos que interactúan con células T también han mostrado resultados prometedores para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama, el linfoma y el mieloma múltiple, cuando dos proteínas se dirigen a las células T y una a una célula tumoral (US10882922B2). Además, se ha propuesto la lisis de células tumorales usando moléculas de unión triespecíficas que interactúan con dos antígenos asociados al tumor expresados en las células cancerosas además de CD3 u otro componente de un complejo TCR en las células T (US20210163620A1).

Se ha demostrado que anticuerpos de redireccionamiento de células inmunitarias multiespecíficas media en la redirección de las células T tanto en investigaciones preclínicas como clínicas (May C et al., (2012) *Biochem Pharmacol*, 84(9): 1105-12; Frankel SR & Baeuerle PA, (2013) *Curr Opin Chem Biol*, 17(3): 385-92; Nie et al., (2020) *Antibody Therapeutics*, 3(1), 17-62), demostrando de esta manera su importancia para el desarrollo de nuevos fármacos y para el tratamiento de enfermedades complejas como enfermedades inflamatorias, trastornos autoinmunes y cáncer, como cánceres

hematológicos, incluido el mieloma múltiple (MM, por sus siglas en inglés) para el cual sigue siendo necesario un tratamiento curativo. El mieloma múltiple es un trastorno neoplásico de células plasmáticas caracterizado por la proliferación clonal de células plasmáticas malignas en el microentorno de la médula ósea (BM, por sus siglas en inglés), la proteína monoclonal en la sangre u orina y la disfunción orgánica asociada. El mieloma múltiple representa el 1-2 % de todos los nuevos diagnósticos de cáncer y aproximadamente el 20 % de todas las muertes por neoplasias malignas de la sangre. La enfermedad es un poco más común en hombres y afroamericanos que en la población general. El mieloma múltiple sigue siendo un cáncer incurable, aunque una mejor comprensión reciente de la patogénesis del mieloma ha llevado al desarrollo de nuevos tratamientos y una mejor supervivencia.

El diagnóstico de mieloma múltiple requiere la presencia de uno o más eventos que definen el mieloma (MDE, por sus siglas en inglés), además de evidencia de un 10 % o más de células plasmáticas clonales en el examen de BM o un plasmocitoma comprobado por biopsia. El MDE incluye las características denominadas CRAB (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas líticas), así como tres biomarcadores específicos: células plasmáticas BM clonales > 60 %, relación de cadenas ligeras libre de suero (sFLC, por sus siglas en

inglés) > 100 (si el nivel de sFLC es > 100 mg/l), y más de 1 lesión focal en imágenes de la resonancia magnética. Varias anomalías genéticas que se producen en las células plasmáticas tumorales desempeñan funciones importantes en la patogénesis del mieloma y determinan el pronóstico de la enfermedad.

El crecimiento no controlado de células de mieloma tiene muchas consecuencias, que incluyen la destrucción esquelética, la falla de la BM, el aumento del volumen y la viscosidad del plasma, la supresión de la producción normal de inmunoglobulinas y la insuficiencia renal.

La enfermedad sintomática (activa) debe tratarse inmediatamente, mientras que el mieloma asintomático (latente) requiere solamente observación clínica, ya que el tratamiento temprano con quimioterapia convencional aún no ha mostrado un beneficio claro. Los ensayos de investigación actualmente evalúan la capacidad de los fármacos inmunomoduladores para retrasar la progresión de mieloma asintomático a sintomático. Para el mieloma activo, los datos actuales respaldan el inicio de regímenes de terapia de inducción que incluyen talidomida, lenalidomida y/o bortezomib seguidos de trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés) después de una respuesta importante de la enfermedad para pacientes que pueden

tolerar regímenes de acondicionamiento de auto-HSCT. Las consideraciones de la edad fisiológica, que puede diferir de la edad cronológica, y la presencia de condiciones coexistentes impulsan las decisiones sobre la elección del tratamiento y la dosis del fármaco. Por ejemplo, los enfoques menos intensos son deseables para pacientes con comorbilidades importantes, que incluyen la insuficiencia cardiopulmonar o hepática, lo que limita la mortalidad relacionada con el tratamiento y mitiga el riesgo de interrupción del tratamiento.

El tratamiento del mieloma múltiple recidivante/refractario (RRMM, por sus siglas en inglés) presenta un desafío terapéutico especial, debido a la heterogeneidad de la enfermedad en el momento de la recaída y la ausencia de recomendaciones biológicas claras con respecto a la elección de terapias de rescate en varios momentos de la progresión de la enfermedad. Con el creciente reconocimiento de la heterogeneidad clonal inherente y la inestabilidad genómica de las células plasmáticas que influyen tanto en la resistencia terapéutica inherente como en la adquirida, la identificación de la elección óptima y la secuencia de terapias se ha vuelto crítica. En los últimos años, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado nuevos agentes para el mieloma recidivante o refractario, incluidos inhibidores del

proteasoma (carfilzomib e ixazomib), medicamentos inmunomoduladores como los derivados de la talidomida pomalidomida y lenalidomida, y el inhibidor de la histona desacetilasa panobinostat. Actualmente se encuentran en desarrollo otras terapias dirigidas molecularmente dirigidas a vías de señalización celular específicas, así como controles de supervivencia y proliferación (incluidos los inhibidores PI3K/AKT/mTOR, inhibidores Hsp90, inhibidores de quinasa dependientes de ciclina, inhibidores de proteína de husillo de quinesina). A pesar de los avances en el manejo del mieloma múltiple, la recaída es inevitable en casi todos los pacientes. La recurrencia del mieloma suele ser más agresiva con cada recaída, que se asocia con una supervivencia más corta. Por lo tanto, se necesitan opciones de tratamiento adicionales.

En los últimos años, los pacientes con mieloma múltiple se han beneficiado de nuevos tratamientos dirigidos a antígenos asociados al MM, como CD38 y BCMA.

El CD38 (UniProt P28907) se identificó por primera vez en 1980 como un marcador de superficie (grupo de diferenciación) de los linfocitos de las células del timo [Lee, HC, ed. (2002). A Natural History of the Human CD38 Gene. Cyclic ADP-Ribose and NAADP. Springer Publishing], En 1992, se describió también como un marcador de superficie en células B, monocitos y células

destructoras naturales (células NK). Casi al mismo tiempo, se descubrió que el CD38 era un marcador de activación de las células B y T. Daratumumab (Darzalex), así como isatuximab (SARCLISA), que se dirigen a CD38, han sido aprobados para el tratamiento del mieloma múltiple.

El antígeno de maduración de células B, también conocido como BCMA, CD269, TNFRSF17 (UniProt Q02223), es un miembro de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral que se expresa preferentemente en células plasmáticas diferenciadas [Laabi et al. (1992) EMBO J 11(11):3897-3904; Madry et al. (1998) Int Immunol 10(11):1693-1702]. BCMA es una proteína transmembrana tipo I no glicosilada, que participa en la maduración, el crecimiento y la supervivencia de las células B. BCMA es un receptor para dos ligandos de la superfamilia TNF: APRIL (un ligando inductor de proliferación, CD256, TNFSF13), el ligando de alta afinidad a BCMA y el factor de activación de células B BAFF (THANK, BlyS, estimulador de linfocitos B, TALL-1 y zTNF4), el ligando de baja afinidad a BCMA. APRIL y BAFF muestran similitud estructural y especificidad de unión al receptor superpuesta pero distinta. El regulador negativo TACI también se une a BAFF y APRIL. La unión coordinada de APRIL y BAFF a BCMA y/o TACI activa el factor de transcripción NF-KB y aumenta la expresión de los miembros de la familia Bcl-2 pro-supervivencia (p. ej., Bcl-2, Bcl-

xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) y regula negativamente la expresión de factores proapoptóticos (p. ej., Bid, Bad, Bik, Bim, etc.), inhibiendo así la apoptosis y promoviendo la supervivencia. Esta acción combinada promueve la diferenciación, proliferación, supervivencia y producción de anticuerpos de las células B (como se revisó en Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133). De acuerdo con este hallazgo, el BCMA también favorece el crecimiento y la supervivencia de las células B malignas humanas, incluidas las células de mieloma múltiple.

Se han desarrollado anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 y BCMA para el tratamiento del MM, como teclistamab, para inducir citotoxicidad mediada por células T contra células de MM que expresan BCMA y/o células RRMM, solos o en combinación con un fármaco inmunoterapéutico como la talidomida o un derivado inmunoterapéutico como un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-PD-L1 (US11124577B2).

Se ha observado una tasa de respuesta general excepcional usando anticuerpos biespecíficos o inmunoterapia con células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés), en la que los linfocitos T se diseñan con receptores de antígenos quiméricos sintéticos. Sin embargo, las respuestas duraderas más allá de los 2 años aún son limitadas (la supervivencia libre de progresión es inferior al 40 %

para el tratamiento con idecabtagén vicleucel (Munshi, N. C. et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. N. Engl. J. Med. 384, 705-716 (2021)) o teclistamab (Moreau, P. et al. Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N. Engl. J. Med. NEJMoa2203478 (2022) doi:10.1056/NEJMoa2203478). Se ha propuesto que una de las posibles razones de la recaída del paciente puede ser la regulación negativa de la diana o la expansión de clones que carecen de suficiente expresión de las dianas (Rodriguez-Lobato, LG, Oliver-Caldes, A., Moreno, DF, Fernandez de Larrea, C. & Blade, J. Why Immunotherapy Fails in Multiple Myeloma. Hemato 2, 1-42 (2020)). Esta baja expresión de dianas en la población MM se ha observado después del tratamiento con daratumumab dirigido a CD38 (Nijhof, I.S. et al. La expresión de CD38 y los inhibidores del complemento afectan la respuesta y la resistencia a la terapia con daratumumab en el mieloma. 128, 12 (2016)) y células T CAR específicas de BCMA (Cohen, AD et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. J. Clin. Invest. 129, 2210-2221 (2019)). En consecuencia, el desarrollo de enfoques que eviten el escape tumoral, a menudo asociado con una menor expresión superficial de antígenos asociados al tumor, sigue siendo un desafío.

Aunque hoy en día existen tratamientos prometedores para los cánceres hematológicos, como el mieloma múltiple, aún es necesario mejorar las terapias, por ejemplo las terapias basadas en anticuerpos que
5 redireccionan las células efectoras. De hecho, a pesar del creciente número de tratamientos disponibles, el pronóstico para los pacientes con mieloma múltiple y mieloma múltiple recidivante o refractario todavía es malo, dada la creciente evidencia de resistencia a los tratamientos
10 actualmente disponibles y la necesidad de maximizar la ventana terapéutica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de antígeno de este
5 que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos uno que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano.

La presente invención también se relaciona con
10 un anticuerpo triespecífico o un fragmento de anticuerpo de este que comprende una cadena ligera común.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos
15 una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
20 seleccionada del grupo que comprende; sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433; sec. con núm. de ident.: 184, sec. con núm. de ident.: 310 y sec. con núm. de ident.: 436; sec. con núm. de ident.: 186, sec. con núm. de ident.: 312 y sec.
25 con núm. de ident.: 438; sec. con núm. de ident.: 188, sec. con núm. de ident.: 314 y sec. con núm. de ident.: 440;

sec. con núm. de ident.: 192, sec. con núm. de ident.: 318
y sec. con núm. de ident.: 444.

La presente invención también se relaciona con
un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de
5 este que comprende al menos tres porciones de unión, al
menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una
que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se
une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de
unión que se une a BCMA humano comprende un conjunto de
10 CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de
aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec.
con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y
sec. con núm. de ident.: 486; sec. con núm. de ident.:
219, sec. con núm. de ident.: 345 y sec. con núm. de
15 ident.: 471; sec. con núm. de ident.: 227, sec. con núm.
de ident.: 353 y sec. con núm. de ident.: 479; sec. con
núm. de ident.: 231, sec. con núm. de ident.: 357 y sec.
con núm. de ident.: 483.

La presente invención también se relaciona con un
20 anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este
que comprende al menos tres porciones de unión, al menos
una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se
une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a
CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión
25 que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de
cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos

que comprende: sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm. de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712; sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec. con núm. de ident.: 491; sec. con núm. de ident.: 237, sec. con núm. de ident.: 363 y sec. con núm. de ident.: 700; sec. con núm. de ident.: 248, sec. con núm. de ident.: 374 y sec. con núm. de ident.: 500.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 55; 58; 60; 62 y 66.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se

une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 592.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente, 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se

une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de
unión que se une a BCMA humano comprende una región
variable de cadena pesada de una cadena pesada que
comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 aproximadamente, 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %
idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del
grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 93,
101, 105 y 108, en donde dichas secuencias de aminoácidos
10 de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108
además comprenden la sustitución N82aS.

La presente invención también se relaciona con
un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de
este que comprende al menos tres porciones de unión, al
15 menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una
que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se
une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de
unión que se une a BCMA humano comprende una región
variable de cadena pesada que comprende una secuencia de
20 aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 591.

La presente invención también se relaciona con
25 un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de
este que comprende al menos tres porciones de unión, al

menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110; 113, 122 y 111.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 593 o 594.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende además una región variable de cadena

ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 55; 58; 60; 62 y 66.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

aproximadamente, 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108; o a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108, en donde dichas secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108 comprenden además la sustitución N82aS.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110; 113, 122 y 111.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende además una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente

85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

La presente invención también se relaciona con
5 un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de
10 unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con
20 núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una
25 porción de unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:
239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec. con núm. de
ident.: 491, y un conjunto de CDR de cadena ligera que
comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con
5 núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec.
con núm. de ident.: 723.

La presente invención también se relaciona con
un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de
este, en donde dicha al menos una porción de unión que se
10 une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena
pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.:
307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un conjunto de CDR
de cadena ligera que comprende una secuencia de
15 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con
núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha
al menos una porción de unión que se une a BCMA comprende
un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:
20 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de
ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que
comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con
núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec.
con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una porción de
25 unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de
CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 236, sec. con
núm. de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712, y un
conjunto de CDR de cadena ligera que comprende una
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:
5 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de
ident.: 723.

La presente invención también se relaciona con
un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de
este, en donde dicha al menos una porción de unión que se
10 une a CD3 humano y/o dicha al menos una porción de unión
que se une a BCMA humano y/o dicha al menos una porción
de unión que se une a CD38 humano es un fragmento Fab.

La presente invención también se relaciona con un
anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este,
15 en donde dicha al menos una porción de unión que se une a
CD3 humano y dicha al menos una porción de unión que se une
a BCMA humano, o dicha al menos una porción de unión que se
une a CD3 humano y dicha al menos una porción de unión que
se une a CD38 humano, o dicha al menos una porción de unión
20 que se une a BCMA humano y dicha al menos una porción de
unión que se une a CD38 humano, están fusionadas entre sí.

La presente invención también se relaciona con un
anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este,
en donde dicha al menos una porción de unión que se une a
25 BCMA humano está fusionada en el extremo N al extremo C de
dicha al menos una porción de unión que se une a CD3

humano, o en donde dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA humano está fusionada en el extremo N al extremo C de dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano.

5 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA humano está fusionada en el extremo C al extremo N de dicha al menos una porción de unión que se une a CD3
10 humano, o en donde dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA humano está fusionada en el extremo C al extremo N de dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano.

 La presente invención también se relaciona con
15 un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA humano, o dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y dicha al menos una
20 porción de unión que se une a CD38 humano, o dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA humano y dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano, están fusionadas entre sí mediante un enlazador peptídico.

25 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este,

en donde dicho anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este comprende un dominio Fc de origen no natural.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende un conjunto de tres cadenas de aminoácidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 522, sec. con núm. de ident.: 523 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 530, sec. con núm. de ident.: 531 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 532, sec. con núm. de ident.: 533 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 534, sec. con núm. de ident.: 535 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 536, sec. con núm. de ident.: 537 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 538, sec. con núm. de ident.: 539 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 540, sec. con núm. de ident.: 541 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 542, sec. con núm. de ident.: 543 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 544, sec. con núm. de ident.: 545 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 546, sec. con núm. de ident.: 547 y sec. con núm. de ident.: 1; y sec. con núm. de ident.: 548, sec. con núm. de ident.: 549 y sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la presente invención se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende tres cadenas de aminoácidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 546, sec. con núm. de ident.: 547 y sec. con núm. de ident.: 1; y sec. con núm. de ident.: 548, sec. con núm. de ident.: 549 y sec. con núm. de ident.: 1.

Con mayor preferencia, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este descrito en la presente descripción, comprende tres cadenas de aminoácidos que tienen secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 546, sec. con núm. de ident.: 547 y sec. con núm. de ident.: 1.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este, en donde dicho anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este es una inmunoglobulina heterodimérica que comprende una primera cadena de inmunoglobulina diseñada que comprende un primer dominio diseñado y una segunda cadena de inmunoglobulina diseñada que comprende un segundo dominio diseñado, en donde dicha inmunoglobulina heterodimérica se heterodimeriza a través de dichos primer y segundo dominios diseñados.

En particular, en donde dicho dominio Fc de origen no natural comprende un primer dominio CH3 diseñado y un segundo dominio CH3 diseñado.

Más en particular, en donde dicho primer dominio
5 CH3 diseñado comprende las sustituciones del grupo que comprende: Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N (numeración de UE), y el segundo dominio CH3 diseñado comprende las sustituciones del grupo que comprende: Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T,
10 T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R (numeración de UE).

La presente invención se relaciona además con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este para su uso como medicamento.

15 En particular, para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple, mieloma múltiple recidivante, mieloma múltiple refractario, mieloma múltiple recidivante/refractario, mieloma múltiple latente, mieloma múltiple activo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia
20 linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, linfoma, cáncer de mama como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, linfoma de células B del centro germinal o leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus
25 siglas en inglés), síndrome mielodisplásico (MDS, por sus siglas en inglés), linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de

células B grandes, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma ovárico seroso de alto grado, cáncer peritoneal.

5 La presente invención también se relaciona con un epítipo en el dominio extracelular de CD38 humano que se une mediante el anticuerpo trispecífico o fragmento de anticuerpo de este descrito en la presente descripción.

 Más particularmente, la presente invención
10 también se relaciona con un epítipo en el dominio extracelular CD38 humano que comprende los residuos Glu103, Gln107, Thr114, Thr116, Arg194, Arg195, Glu198, Ala199, Asp202, Ser224, His228, Asn229, Gln231, Pro232, Glu233, Lys234, Val235, Gln236, Ile265, Ser267, Lys268, Arg269 y
15 Asn270, detectados por cristalografía de rayos X. En particular, tal como se detecta mediante cristalografía de rayos X, que tiene una resolución de al menos 5 Å, preferentemente de al menos Å, aun con mayor preferencia de al menos 3,5 Å. En un ejemplo más preferido, la resolución
20 es de aproximadamente 3,4 Å.

 Más particularmente, la presente invención también se relaciona con un epítipo en el dominio extracelular CD38 humano que está unido por el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y
25 que comprende los residuos Glu103, Gln107, Thr114, Thr116, Arg194, Arg195, Glu198, Ala199, Asp202, Ser224,

His228, Asn229, Gln231, Pro232, Glu233, Lys234, Val235, Gln236, Ile265, Ser267, Lys268, Arg269 y Asn270, detectados por cristalografía de rayos X. En particular, tal como se detecta mediante cristalografía de rayos X, que tiene una resolución de al menos 5 Å, preferentemente de al menos Å, aun con mayor preferencia de al menos 3,5 Å. En un ejemplo más preferido, la resolución es de aproximadamente 3,4 Å.

La presente invención también se relaciona con un epítopo en el dominio extracelular de BCMA humano que se une mediante el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este descrito en la presente descripción.

La presente invención también se relaciona con un epítopo en el dominio extracelular de CD3 humano que se une mediante el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este descrito en la presente descripción.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este o fragmento de unión a antígeno que se une al mismo epítopo en CD3, y/o BCMA, y/o CD38 como anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo de este, en donde el anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo de este es un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 181,

sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha al menos una
5 porción de unión que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm.
10 de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec. con núm. de ident.: 491, y un
15 conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une
20 al mismo epítipo en CD3 que un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia es un anticuerpo triespecífico, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano, y/o BCMA, y/o CD38 comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que
25 comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un

conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con
núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec.
con núm. de ident.: 723; dicha al menos una porción de
unión que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de
5 cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.:
234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de
ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que
comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm.
de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al
10 menos una porción de unión que se une a CD38 humano
comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que
comprende la sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm.
de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712, y un
conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con
15 núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec.
con núm. de ident.: 723.

La presente invención también se relaciona con
un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une
a un epítipo en el CD3 humano, en donde dicho epítipo en
20 CD3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con
núm. de ident.: 726.

La presente invención también se relaciona con
un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une
a un epítipo en el CD38 humano, en donde dicho epítipo en
25 CD3 comprende los residuos Glu103, Gln107, Thr114,
Thr116, Arg194, Arg195, Glu198, Ala199, Asp202, Ser224,

His228, Asn229, Gln231, Pro232, Glu233, Lys234, Val235, Gln236, Ile265, Ser267, Lys268, Arg269 y Asn270, como se detecta por cristalografía de rayos X. En particular, tal como se detecta mediante cristalografía de rayos X, que
5 tiene una resolución de al menos 5 Å, preferentemente de al menos Å, aun con mayor preferencia de al menos 3,5 Å. En un ejemplo más preferido, la resolución es de aproximadamente 3,4 Å.

La presente invención también se relaciona con un
10 ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo triespecífico descrito en la presente descripción.

La presente invención también se relaciona con una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado.

15 La presente invención se relaciona además con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une a CD3 humano, que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de
20 ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433; sec. con núm. de ident.: 184, sec. con núm. de ident.: 310 y sec. con núm. de ident.: 436; sec. con núm. de ident.: 186, sec. con núm. de ident.: 312 y sec. con núm. de ident.: 438; sec. con núm. de ident.: 188, sec.
25 con núm. de ident.: 314 y sec. con núm. de ident.: 440; sec. con núm. de ident.: 192, sec. con núm. de ident.: 318

y sec. con núm. de ident.: 444, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

5 La presente invención se relaciona además con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une a BCMA humano, que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de
10 ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486; sec. con núm. de ident.: 219, sec. con núm. de ident.: 345 y sec. con núm. de ident.: 471; sec. con núm. de ident.: 227, sec. con núm. de ident.: 353 y sec. con núm. de ident.: 479; sec. con núm. de ident.:
15 231, sec. con núm. de ident.: 357 y sec. con núm. de ident.: 483, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

20 La presente invención se relaciona además con un anticuerpo heterodimérico triespecífico que comprende un primer y un segundo dominio CH3 diseñado, en donde dicho primer dominio CH3 diseñado comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que comprende: Q347A,
25 S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N (numeración de UE) y dicho segundo dominio CH3 diseñado

comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que comprende: Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R (numeración de UE), y en donde la inmunoglobulina heterodimérica
5 triespecífica o fragmento heterodímero se heterodimeriza a través de los primer y segundo dominios CH3 diseñados, caracterizado porque dicho anticuerpo heterodímero triespecífico de este comprende al menos tres porciones de unión, cada porción de unión que se une a un antígeno
10 diferente.

En particular, la presente invención se relaciona con un anticuerpo heterodimérico triespecífico que comprende un primer y un segundo dominio CH3 diseñado, en donde dicho primer dominio CH3 diseñado comprende las
15 sustituciones del grupo que comprende: Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N (numeración de UE), y el segundo dominio CH3 diseñado comprende las sustituciones del grupo que comprende: Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L,
20 D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R (numeración de UE), y en donde la inmunoglobulina heterodímera triespecífica o fragmento heterodímero se heterodimeriza a través de los primer y segundo dominios CH3 diseñados, caracterizado porque dicho anticuerpo heterodímero triespecífico o
25 fragmento de anticuerpo de este comprende al menos tres

porciones de unión, cada porción de unión que se une a un antígeno diferente.

En la presente descripción se proporcionan anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a BCMA, CD38 y CD3 humanos y fragmentos de unión a antígenos de estos. También se describen polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos específicos de BCMA, específicos de CD38 y específicos de CD3 y los fragmentos de unión al antígeno proporcionados, células que expresan los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno proporcionados, así como vectores asociados y anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno marcados de forma detectable. Además, se describen métodos de uso de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos específicos de BCMA y/o los anticuerpos específicos de CD38 y los fragmentos de unión al antígeno se pueden usar para diagnosticar o monitorear la progresión, regresión o estabilidad del cáncer que expresa BCMA y/o del cáncer que expresa CD38; para determinar si un paciente debe o no recibir tratamiento contra el cáncer; o para determinar si un sujeto padece o no cáncer que expresa BCMA y/o cáncer que expresa CD38 y por lo tanto puede ser susceptible de tratamiento con un agente anticanceroso específico de BCMA y/o cáncer que expresa CD38, como los anticuerpos

multiespecíficos contra BCMA, CD38 y CD3 descritos en la presente descripción.

Además, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos multiespecíficos que se unen
5 inmunoespecíficamente a BCMA, CD38 y CD3 y fragmentos de unión a antígenos multiespecíficos de estos. También se describen polinucleótidos relacionados capaces de codificar los anticuerpos multiespecíficos BCMAxCD38xCD3 proporcionados, células que expresan los anticuerpos
10 proporcionados, así como vectores asociados y anticuerpos multiespecíficos marcados de forma detectable. Además, se describen métodos de uso de los anticuerpos multiespecíficos proporcionados. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos BCMAxCD38xCD3 se pueden usar
15 para diagnosticar o monitorear la progresión, regresión o estabilidad del cáncer que expresa BCMA y/o el cáncer que expresa CD38, para determinar si un paciente debe o no recibir tratamiento contra el cáncer; o para determinar si un sujeto padece o no cáncer que expresa BCMA y/o
20 cáncer que expresa CD38 y, por lo tanto, puede ser susceptible de tratamiento con un tratamiento anticanceroso específico para BCMA y/o un tratamiento anticanceroso específico para CD38, como los anticuerpos multiespecíficos BCMAxCD38xCD3 descritos en la presente
25 descripción.

Tal como se utilizan de acuerdo con la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique de cualquier otra manera, se entenderán que tienen los siguientes significados. A menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una molécula” incluye opcionalmente una combinación de dos o más moléculas y lo similar.

Se entiende que los aspectos y modalidades de la presente descripción descritos en la presente descripción incluyen “comprende”, “consta” y “consiste esencialmente” en aspectos y modalidades.

El término “polinucleótido”, como se usa en la presente descripción, se refiere a polímeros de ácido nucleico monocatenario o bicatenario de al menos 10 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Tales modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como

bromuridina, modificaciones ribosa tales como arabinósida y 2',3'-didesoxirribosa, y enlaces internucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término “polinucleótido” incluye específicamente formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Un “polinucleótido aislado” es un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna combinación de estos, que: (1) no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) se une a un polinucleótido al cual no se une por naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Un “polipéptido aislado” es uno que: (1) está libre de al menos algunos de los otros polipéptidos con los que se encontraría normalmente, (2) está esencialmente libre de otros polipéptidos de la misma fuente, p. ej., de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está asociado en la naturaleza, (5) no se asocia (por interacción covalente o no covalente) con porciones de un polipéptido con el cual el “polipéptido aislado” se asocia en la

naturaleza, (6) se asocia operativamente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el cual no está asociado en la naturaleza, o (7) no ocurre en la naturaleza. Tal polipéptido aislado puede codificarse por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de estos. Preferentemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su ambiente natural que interferirían con su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación o de cualquier otra manera).

La presente invención se relaciona con una molécula de unión multiespecífica, por ejemplo una proteína de unión multiespecífica, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de esta, que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano.

El término “proteína de unión” o “molécula de unión” como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula no natural, recombinante o diseñada, p. ej., una proteína, tal como un anticuerpo no natural, recombinante o diseñado, que se une específicamente a al menos un antígeno diana, p. ej., un polipéptido de CD38, polipéptido de BCMA o un polipéptido de CD3 de la presente descripción.

Una molécula “recombinante” es aquella que se ha sido preparada, expresada, creada o aislada por medios recombinantes.

Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” como se hace referencia en la presente descripción se usan de indistintamente e incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno o cadenas individuales de estos. Los anticuerpos de origen natural comprenden, típicamente, un tetrámero. Cada uno de tales tetrámeros está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, en donde cada par tiene una cadena “ligera” de longitud completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” de longitud completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Los términos “cadena pesada” y “cadena ligera”, como se usan en la presente descripción, se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene una secuencia de dominio variable suficiente para conferir especificidad para un antígeno diana. La porción aminoterminal de cada cadena ligera y pesada incluye típicamente un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente son responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena típicamente define un dominio constante responsable de la

función efectora. Por lo tanto, en un anticuerpo natural, un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada de longitud completa incluye un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), en donde el dominio VH está en el terminal amino del polipéptido y el dominio CH3 está en el terminal carboxilo, y un polipéptido de inmunoglobulina de cadena ligera de longitud completa incluye un dominio variable (VL, por sus siglas en inglés) y un dominio constante (CL, por sus siglas en inglés), en donde el dominio VL está en el terminal amino del polipéptido y el dominio CL está en el terminal carboxilo.

Las cadenas ligeras humanas se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda, y las cadenas pesadas humanas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgM tiene subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. La IgA se subdivide de manera similar en subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, los dominios variables y constantes se unen, típicamente, por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada que incluye, también, una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Ver, p. ej.,

FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2nd ed., 1989), que se incorpora como referencia en su totalidad para todos los fines. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente un sitio de unión al antígeno. Los dominios variables de anticuerpos naturales típicamente exhiben la misma estructura general de regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean típicamente por las regiones marco, lo que puede permitir la unión a un epítipo específico. Del terminal amino al terminal carboxilo, los dominios variables de la cadena ligera y pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

El término “conjunto de CDR” se refiere a un grupo de tres CDR que se producen en una sola región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también

proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse las CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia and Lesk, 1987, J. Mol Biol. 196: 901-17; Chothia et al, 1989, Nature 342: 877-83) descubrieron que ciertas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la “L” y la “H” designan las regiones de cadena ligera y pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Otros límites que definen las CDR que se superponen con las CDR de Kabat han sido descritos por Padlan, 1995, FASEB J. 9: 133-39; MacCallum, 1996, J. Mol. Biol. 262(5): 732-45; y Lefranc, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77. Es posible que otras definiciones de los límites de la CDR no sigan estrictamente uno de los sistemas de la presente descripción, pero, sin embargo, se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque se pueden acortar o alargar a la luz de la predicción o los hallazgos experimentales de que determinados residuos o grupos de residuos o incluso CDR completas no afectan significativamente la unión al antígeno. Los métodos usados en la presente descripción pueden utilizar a las CDR definidas de acuerdo con

cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas modalidades usan las CDR definidas por Kabat o Chothia. La identificación de las CDR predichas usando la secuencia de aminoácidos es bien conocida en el campo, tal como en

5 Martin, A.C. "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains", en *Antibody Engineering*, vol. 2. Kontermann R., Dubel S., eds. Springer-Verlag, Berlin, p. 33-51 (2010). La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o ligera también puede

10 inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR mediante otros métodos convencionales, p. ej., mediante la comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de

15 secuencias. Las secuencias numeradas pueden alinearse a simple vista o empleando un programa de alineación como uno de los programas CLUSTAL, como se describe en Thompson, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-80. Los modelos moleculares se usan convencionalmente para

20 delinear correctamente las regiones marco y CDR y, por lo tanto, corregir las asignaciones basadas en secuencias. Todas estas definiciones alternativas están abarcadas por la presente invención y las secuencias proporcionadas en esta especificación no pretenden excluir secuencias de CDR

25 definidas alternativas que solo pueden comprender una porción de las secuencias de CDR proporcionadas en el

listado de secuencias. En una modalidad preferida de la presente invención, CDRH1, corresponde a las posiciones de Kabat 26-35, CDRH2 corresponde a las posiciones de Kabat 50-58 y CDRH3, corresponde a las posiciones de Kabat 93-102. En otra modalidad preferida, CDRL1, corresponde a las posiciones de Kabat 24-34, CDRL2 corresponde a las posiciones de Kabat 50-56 y CDRL3, corresponde a las posiciones de Kabat 89-97.

El término “fragmento de anticuerpo”, como se usa en la presente descripción, incluye una porción de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de anticuerpos incluyen: (i) el fragmento cristalizante (Fc) compuesto por dos fragmentos de cadena pesada constante que consisten en dominios CH2 y CH3, en IgA, IgD e IgG, y de dominios CH2, CH3 y CH4, en IgE e IgM, y que están apareados por enlaces disulfuro e interacciones no covalentes; (ii) el fragmento de unión al antígeno (Fab), constituido por VL, CL y VH, CH1 conectados por enlaces disulfuro; (iii) Fab', que consiste en VL, CL y VH, CH1 conectados por enlaces disulfuro, y de uno o más residuos de cisteína de la región bisagra; (iv) Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que los residuos de cisteína contienen un grupo sulfhidrilo libre; (v) F(ab')₂ que consiste en dos fragmentos Fab conectados en la región de bisagra por un enlace disulfuro; (vi) los fragmentos variables (Fv), que consisten en cadenas VL y VH,

emparejadas entre sí mediante interacciones no covalentes;
(vii) los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv),
que consisten en cadenas VL y VH emparejadas entre sí por
un enlazador; (ix) los dímeros Fv de cadena sencilla
5 biespecíficos, (x) el fragmento scFv-Fc; (xi) un fragmento
Fd que consiste en los dominios VH y CHI; (xii) el
anticuerpo de dominio único, dAb, que consiste en un
dominio VH o un dominio VL; (xiii) diacuerpos, que
consisten en dos fragmentos scFv en los que los dominios VH
10 y VL están conectados por un péptido corto que impide su
apareamiento en la misma cadena y permite la dimerización
no covalente de los dos scFv; (xiv) los triacuerpos
trivalentes, donde tres scFv, con dominios VH y VL
conectados por un péptido corto, forman un trímero; y lo
15 similar.

El término "Fc", como se usa en la presente
descripción, se refiere a una molécula que comprende la
secuencia de un fragmento que no se une al antígeno que
resulta de la digestión de un anticuerpo o es producida por
20 otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y
puede contener la región bisagra. La fuente original de
inmunoglobulina del Fc nativo es, preferentemente, de
origen humano y puede ser cualquiera de las
inmunoglobulinas. Las moléculas de Fc están compuestas de
25 polipéptidos monoméricos que pueden unirse en formas
diméricas o multiméricas por asociación covalente (es

decir, enlaces disulfuro) y no covalente. La cantidad de enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de las moléculas Fc nativas oscila entre 1 a 4 dependiendo de la clase (p. ej., IgG, IgA e IgE) o la subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2 y IgG4). Un ejemplo de Fc es un dímero unido por disulfuro que resulta de la digestión con papaína de una IgG. El término "Fc nativo", como se usa en la presente descripción, es genérico a las formas monoméricas, dimericas y multiméricas.

Un fragmento F(ab) típicamente incluye una cadena ligera y los dominios VH y CH1 de una cadena pesada, en donde la porción de la cadena pesada VH-CH1 del fragmento F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otro polipéptido de cadena pesada. Como se usa en la presente descripción, un fragmento F(ab) también puede incluir una cadena ligera que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácidos y una cadena pesada que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácidos y un dominio CH1.

Un fragmento F(ab') incluye típicamente una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene más de la región constante (entre los dominios CH1 y CH2), de tal manera que se puede formar un enlace

disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂.

Una modalidad de la descripción proporciona proteínas de unión que tienen especificidad biológica e inmunológica entre uno y tres antígenos diana.

El término “antígeno” o “antígeno diana”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de unirse a una proteína de unión, y/o además es capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopos. Con respecto a cada antígeno diana reconocido por una proteína de unión, la proteína de unión es capaz de competir con un anticuerpo intacto y/o un fragmento de anticuerpo de este que reconoce el antígeno diana. El antígeno está unido por una proteína de unión, tal como un anticuerpo, a través de un sitio de unión al antígeno, también denominado en la presente descripción como “porción de unión” o “dominio de unión”.

En ciertas modalidades de la presente invención, una o más porciones de unión del anticuerpo descrito en la presente descripción son un fragmento de anticuerpo seleccionado del ejemplo no limitante de fragmentos de anticuerpo enumerados anteriormente. En modalidades particulares, una o más porciones de unión del anticuerpo descrito en la presente descripción son fragmentos Fab. En

una modalidad más particular, todas las porciones de unión del anticuerpo de la presente invención son fragmentos Fab.

Basado en el número de sitios de unión al antígeno, una proteína de unión, como un anticuerpo o un
5 fragmento de anticuerpo, puede clasificarse como monovalente o multivalente. El término “valencia” se usa en la presente descripción para indicar el número de sitios de unión. El término “proteína de unión monovalente” se refiere a una proteína de unión que tiene un sitio de unión al
10 antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo monovalente es aquel que tiene un sitio de unión al antígeno. El término “proteína de unión multivalente” se refiere a una proteína de unión que tiene más de un sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo multivalente es aquel que tiene
15 más de un sitio de unión al antígeno. Ejemplos no limitativos de proteínas de unión multivalentes son bivalentes y trivalentes. El término “proteína de unión bivalente” se refiere a una proteína de unión que tiene dos sitios de unión al antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo
20 bivalente es aquel que tiene dos sitios de unión al antígeno. El término “proteína de unión trispecífica” se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a tres dianas de antígeno diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo trivalente es aquel que tiene tres sitios de
25 unión al antígeno.

El término “proteína de unión monoespecífica” se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno diana.

El término “proteína de unión multiespecífica”,
5 como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier proteína de unión, incluido un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este, que tiene más de un sitio de unión y que se une a diferentes epítomos del mismo antígeno o a diferentes dianas de antígeno.

10 El término “proteína de unión biespecífica” se refiere a una proteína de unión, que incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este, que se une específicamente a dos dianas de antígeno diferentes. En algunas modalidades, una proteína de unión biespecífica,
15 tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este, se une a dos antígenos diferentes. En algunas modalidades, una proteína de unión biespecífica se une a dos epítomos diferentes en el mismo antígeno.

En algunas modalidades, una proteína de unión
20 triespecífica, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de este, se une a tres antígenos diferentes. En algunas modalidades, una proteína de unión triespecífica se une a uno, dos o tres epítomos diferentes en el mismo antígeno.

25 Una proteína de unión trivalente puede unirse a un antígeno diana (es decir, proteína de unión trivalente

monoespecífica). En otras modalidades, la proteína de unión trivalente puede unirse a dos dianas de antígeno (es decir, proteína de unión trivalente biespecífica). En otras modalidades, la proteína de unión trivalente puede unirse a tres dianas de antígeno (es decir, proteína de unión trivalente triespecífica).

El término “epítopo” incluye cualquier determinante, preferentemente, un determinante de polipéptido, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas modalidades, los determinantes de epítopo incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo o proteína de unión. En ciertas modalidades, se dice que una proteína de unión se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En algunas modalidades, se dice que una proteína de unión se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio (K_D) es por ejemplo $< 10^{-8}M$, con mayor preferencia cuando la

constante de disociación de equilibrio es $< 10^{-9}M$, y con la máxima preferencia cuando la constante de disociación es $< 10^{-10} M$.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo descrito en la presente descripción es trivalente, preferentemente es triespecífico, con mayor preferencia es un anticuerpo triespecífico que comprende al menos tres porciones de unión; En una modalidad particular, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo triespecífico o un fragmento de anticuerpo de este, que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano.

“CD3” es el grupo de diferenciación 3, un complejo proteico multimérico compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas: épsilon (ϵ), gamma (γ), delta (δ) y zeta (ζ), que se ensamblan y funcionan como tres pares de dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$). En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une al dominio extracelular de uno o más cadena de polipéptidos de CD3, es decir $CD3\epsilon$, $CD3\gamma$, $CD3\delta$ y $CD3\zeta$. Las secuencias de polipéptidos de dominio extracelular de CD3 ilustrativa incluyen, pero no se limitan a, el dominio extracelular de $CD3\epsilon$ humana (p. ej., como se representa por la sec. con núm. de ident.: 610) y el dominio extracelular de $CD3\epsilon$ del

mono cynomolgus (p. ej., como se representa por la sec. con
núm. de ident.: 614); el dominio extracelular de CD3 δ
humana (p. ej., como se representa por la sec. con núm. de
ident.: 611) y el dominio extracelular de CD3 δ del mono
5 cynomolgus (p. ej., como se representa por la sec. con núm.
de ident.: 613); el dominio extracelular del CD3 γ humano
(p. ej., como se representa en sec. con núm. de ident.:
612) y el dominio extracelular del CD3 γ de mono cynomolgus;
el dominio extracelular del CD3 ζ humano y el dominio
10 extracelular del CD3 ζ del mono cynomolgus.

“BCMA” es el antígeno de maduración de células
B, también conocido como miembro 17 de la superfamilia
del receptor del factor de necrosis tumoral; BCMA se
expresa en los linfocitos B maduros y se sobreexpresa en
15 las células plasmáticas malignas. En algunas modalidades,
una proteína de unión de la presente descripción se une
al dominio extracelular de uno o más polipéptidos de
BCMA. Las secuencias de polipéptidos de dominio
extracelular de BCMA ilustrativo incluyen, pero no se
20 limitan a, el dominio extracelular de BCMA humano (p.
ej., como se representa por la sec. con núm. de ident.:
615) y el dominio extracelular de BCMA del mono
cynomolgus (p. ej., como se representa por la sec. con
núm. de ident.: 616).

25 La “CD38” es un grupo de polipéptidos de
diferenciación 38, una glicoproteína que se encuentra en la

superficie de muchas células inmunitarias. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se une al dominio extracelular de uno o más polipéptidos de CD38. Las secuencias de polipéptidos de dominio extracelular de CD38 ilustrativa incluyen, pero no se limitan a, el dominio extracelular de CD38 humano (p. ej., como se representa por la sec. con núm. de ident.: 617) y el dominio extracelular de CD38 del mono cynomolgus (p. ej., como se representa por la sec. con núm. de ident.: 618).

El término “activador de células T” se refiere a proteínas de unión dirigidas al sistema inmunológico de un huésped, más específicamente a la actividad citotóxica de las células T, así como dirigidas a una proteína tumoral diana.

En modalidades preferidas, la presente invención proporciona un anticuerpo triespecífico o un fragmento de anticuerpo de este que se une a un CD3 humano y a un BCMA humano, y a un CD38 humano. En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo es monoclonal.

En una modalidad particular, el anticuerpo triespecífico de la presente descripción comprende una cadena ligera común.

Una proteína de unión “aislada” es aquella que se ha identificado y separado y/o recuperado de un

componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para la proteína de unión, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En algunas modalidades, se purificará la proteína de unión: (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, y con la máxima preferencia de más de 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos de N-terminal o internos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. Las proteínas de unión aisladas incluyen la proteína de unión in situ dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural de la proteína de unión no estará presente.

Los términos “sustancialmente puro” o “sustancialmente purificado”, como se usan en la presente descripción, se refieren a un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar que es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En algunas modalidades, una fracción sustancialmente purificada es

una composición en donde la especie comprende al menos aproximadamente 50 %) (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras modalidades, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 %>, 85 %>, 90 %, 95 % o 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En aún otras modalidades, la especie se purifica hasta la homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Un ácido nucleico está “aislado” o “sustancialmente puro” cuando se purifica por separado de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen el tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otras conocidas en la técnica, ver, p. ej., F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias de intrones.

Se puede determinar la constante de disociación (K_D) de una proteína de unión puede determinarse, por

ejemplo, mediante resonancia de plasmones superficiales. Generalmente, el análisis de la resonancia de plasmones superficiales mide las interacciones de unión en tiempo real entre el ligando (un antígeno diana en una matriz de biosensor) y el analito (una proteína de unión en solución) mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) usando el sistema BIAcore (GE). El análisis de plasmones superficiales también se puede realizar inmovilizando el analito (proteína de unión en una matriz de biosensor) y presentando el ligando (antígeno diana). El término " K_D " como se usa en la presente descripción se refiere a la constante de disociación de la interacción entre una proteína de unión particular o una porción de unión de una proteína de unión o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta y un antígeno diana y/o un epítipo de antígeno.

El término "se une a", como se usa en la presente descripción en referencia a una proteína de unión, se refiere a la capacidad de una proteína de unión o un fragmento de unión al antígeno de esta para unirse a un antígeno que contiene un epítipo con una K_D de al menos aproximadamente $1 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-7}M$, $1 \times 10^{-8}M$, $1 \times 10^{-9}M$, $1 \times 10^{-10}M$, $1 \times 10^{-11}M$, $1 \times 10^{-12}M$, o menos, y/o para unirse a un epítipo con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

El término “enlazador”, como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más residuos de aminoácidos insertados entre dominios de inmunoglobulina para proporcionar suficiente movilidad para los dominios de las cadenas ligeras y pesadas para plegarse en comparación con las inmunoglobulinas de región variable doble. Se puede insertar un enlazador en la transición entre dominios variables o entre dominios variables y constantes, respectivamente, en el nivel de secuencia. La transición entre dominios se puede identificar porque se comprende bien el tamaño aproximado de los dominios de inmunoglobulina. La ubicación precisa de una transición de dominio se puede determinar ubicando tramos de péptidos que no forman elementos estructurales secundarios, tales como las láminas beta o las hélices alfa, como lo demuestran los datos experimentales o como se puede suponer mediante técnicas de modelado o predicción de estructuras secundarias.

En ciertas modalidades, la descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cadenas de polipéptidos que forman las proteínas de unión de la presente invención. Otra modalidad de la descripción proporciona vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cadenas de polipéptidos que

forman tales proteínas de unión. Otra modalidad más de la descripción proporciona células huésped que expresan tales proteínas de unión (es decir, que comprenden moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican 5 cadenas de polipéptidos que forman tales proteínas de unión).

El término “vector”, como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier molécula (p. ej., ácido nucleico, plásmido) u otros medios (p. ej., un virus) que 10 se usa para transferir y/o proporcionar información de codificación a una célula huésped. El término “vector” incluye una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido” que se refiere a una molécula de 15 ADN bicatenario circular en la que se pueden insertar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden insertar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral, en particular en donde los ácidos nucleicos que facilitan el ensamblaje viral se 20 combinan con información de codificación para facilitar la transferencia a la célula huésped mediante partículas similares a virus.

Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (p. 25 ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de

mamíferos). Otros vectores (p. ej., vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del huésped.

5 Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente descripción “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente “vectores de expresión”). En general, los vectores de

10 expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. Los términos “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente en la presente descripción, ya que un plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la descripción pretende

15 incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con defectos de replicación), que cumplen funciones equivalentes.

La frase “célula huésped recombinante” (o “célula

20 huésped”), como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Una célula huésped recombinante o célula huésped pretende referirse no solo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de tal

25 célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones

en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero tales células aún están incluidas dentro del alcance del término “célula huésped” como se usa en la presente descripción. Se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión de células huésped para expresar las proteínas de unión, incluidos sistemas de expresión bacterianos, de levadura, baculovirales y de mamíferos (así como sistemas de expresión de presentación en fagos). Para expresar una proteína de unión recombinante, una célula huésped se transforma o transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que transportan fragmentos de ADN que codifican las cadenas de polipéptidos de la proteína de unión, de tal manera que las cadenas de polipéptidos se expresan en la célula huésped y, preferentemente, se segregan en el medio en el que se cultivan las células huésped, a partir del cual puede recuperarse la proteína de unión.

El término “transformación”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula ha sido transformada cuando ha sido modificada para contener un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma donde se modifica genéticamente a partir de su estado nativo. Después de la transformación, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente

en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse transitoriamente como un elemento episomal sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula. El término “transfección”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la absorción de ADN extraño o exógeno por una célula, y una célula ha sido “transfectada” cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Se conocen varias técnicas de transfección en la técnica. Tales técnicas se pueden usar para introducir una o más moléculas de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

El término “de origen natural”, como se usa en la presente descripción y se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza y no ha sido manipulado por el hombre. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que está presente en un organismo (que incluye virus) que se puede aislar de una fuente de la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el hombre es de origen natural. Similarmente, “de origen artificial”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un objeto que no ocurre naturalmente o que ha sido modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

Como se usa en la presente descripción, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Los estereoisómeros (p. ej., aminoácidos D) de los veinte aminoácidos convencionales; aminoácidos no naturales y análogos, tales como aminoácidos α , aminoácidos α -di sustituidos, N-alquil aminoácidos, aminoácidos de ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales pueden ser, también, componentes adecuados para las cadenas de polipéptidos de las proteínas de unión. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, prurito-N, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetil serina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e imino ácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica usada en la presente descripción, la dirección izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección derecha es la dirección del terminal carboxilo, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

Los residuos de origen natural pueden dividirse en clases basadas en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrofóbico: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;

- (2) hidrófilo polar: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu,
His, Lys, Ser, Thr;
- (3) alifático: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
- (4) hidrofóbico alifático: Ala, Ile, Leu, Val,
5 Pro;
- (5) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn,
Gln;
- (6) ácido: Asp, Glu;
- (7) básico: His, Lys, Arg;
- 10 (8) residuos que influyen en la orientación de
la cadena: Gly, Pro;
- (9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; y
- (10) hidrofóbico aromático: Phe, Trp, Tyr.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos
15 pueden implicar el intercambio de un miembro de una de
estas clases con otro miembro de la misma clase. Las
sustituciones no conservadoras pueden implicar el
intercambio de un miembro de una de estas clases para un
miembro de otra clase.

20 Un experto en la técnica podrá determinar las
variantes adecuadas de las cadenas de polipéptidos de las
proteínas de unión usando técnicas conocidas. Por ejemplo,
un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas
de una cadena de polipéptidos que pueden cambiarse sin
25 destruir la actividad dirigiéndose a regiones que no se
cree que sean importantes para la actividad.

Alternativamente, un experto en la técnica puede identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Además, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura polipeptídica.

El término porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son “sustancialmente idénticas” si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (p. ej., al menos 60 % de identidad, por ejemplo 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad), cuando se comparan y alinean para lograr la máxima correspondencia en una región específica o, cuando no se especifica, en toda la secuencia. Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien

conocidos por una persona experta en la técnica. Ejemplos no limitativos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; y Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica; Algoritmo Clustal Omega (Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. Protein Sci. 2018 Jan;27(1):135-145.); Algoritmo MUSCLE (Edgar, RC MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 5, 113 (2004). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>).

Los términos “paciente” o “sujeto” se usan en la presente descripción indistintamente. El término “paciente”, como se usa en la presente descripción, incluye sujetos humanos y animales. Los sujetos animales incluyen todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, como primates no humanos, ovejas, perros, vacas y pollos.

Los términos “tratamiento” o “tratar”, como se usan en la presente descripción, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas

o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que tienen un trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. En modalidades
5 particulares de la presente invención, el trastorno se caracteriza por la expresión, p. ej., sobreexpresión de BCMA, y/o expresión, p. ej., sobreexpresión de CD38, incluso en cáncer y en enfermedades no cancerosas tales como trastornos del sistema gastrointestinal, neurológico
10 y pulmonar (Szlasa W et al., Targeting CD38 in Neoplasms and Non-Cancer Diseases). Cancers. 2022 Aug 28;14(17):4169); Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este de acuerdo con la presente invención se puede usar para tratar neoplasias malignas
15 de células B y trastornos autoinmunes. En otras modalidades particulares, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención pueden usarse para tratar seres humanos con cáncer, o seres humanos susceptibles al cáncer, o mejorar el cáncer en un sujeto
20 humano. El anticuerpo también se puede usar para evitar el cáncer en un paciente humano. En modalidades más particulares, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención se usa para tratar el cáncer, tal como neoplasias hematológicas. En modalidades
25 preferidas, el cáncer es un cáncer que expresa BCMA y/o un cáncer que expresa CD38. Los ejemplos no limitantes de

cánceres tratados por el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención comprenden leucemia, tal como leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia monocítica aguda y leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, mieloma múltiple recidivante, mieloma múltiple refractario, mieloma múltiple recidivante/refractario, mieloma múltiple latente, mieloma múltiple activo, leucemia de células plasmáticas, linfoma, linfoma de células B del centro germinal o leucemia linfoblástica aguda de células B, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de mama tal como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma ovárico seroso de alto grado, cáncer peritoneal, mieloma latente, glioma.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo trispecífico o fragmento de anticuerpo de este para su uso como un medicamento. En particular, para su uso en el tratamiento de los trastornos mencionados anteriormente; particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer y trastornos autoinmunes, más

particularmente para su uso en el tratamiento de cánceres hematológicos, incluidos, pero sin limitarse a, los mencionados anteriormente. En una modalidad preferida, el anticuerpo triespecífico de la presente invención es para
5 uso en el tratamiento del mieloma múltiple, incluyendo mieloma múltiple recidivante, mieloma múltiple refractario, mieloma múltiple recidivante/refractario, mieloma múltiple latente y mieloma múltiple activo.

La presente invención también se relaciona con
10 el uso del anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención para el tratamiento de los trastornos mencionados anteriormente; particularmente para el tratamiento del cáncer y trastornos autoinmunes, más particularmente para el
15 tratamiento de cánceres hematológicos, incluidos, entre otros, los mencionados anteriormente. En una modalidad preferida, la presente invención se relaciona con un uso del anticuerpo triespecífico descrito en la presente descripción para el tratamiento del mieloma múltiple,
20 incluyendo mieloma múltiple recidivante, mieloma múltiple refractario, mieloma múltiple recidivante/refractario, mieloma múltiple latente y mieloma múltiple activo.

La presente invención también se relaciona con métodos para tratar un cáncer y trastornos autoinmunes
25 que comprenden la etapa de administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del

anticuerpo triespecífico de la presente invención. En particular, la presente invención también se relaciona con métodos para tratar un cáncer hematológico que comprenden la etapa de administrar a un paciente que lo
5 necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención. Más en particular, el cáncer hematológico se selecciona de la lista que comprende, pero no se limita a, los mencionados
10 anteriormente. En una modalidad preferida, la presente invención se relaciona con métodos para tratar el mieloma múltiple, incluyendo el mieloma múltiple recidivante, el mieloma múltiple refractario, el mieloma múltiple recidivante/refractario, el mieloma múltiple latente y el
15 mieloma múltiple activo, que comprenden la etapa de administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este descrito en la presente descripción.

20 La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo triespecífico y que, por ejemplo, contienen uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que
25 comprenden el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente descripción, una

preparación de MBM se puede combinar con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables o portadores farmacéuticamente aceptables.

Los términos “composición farmacéutica” o
5 “composición terapéutica”, como se usan en la presente descripción, se refieren a un compuesto o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

El término “portador farmacéuticamente
10 aceptable” o “portador fisiológicamente aceptable”, como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más materiales de formulación adecuados para lograr o mejorar la administración de una proteína de unión.

Los términos “cantidad efectiva” y “cantidad
15 terapéuticamente efectiva” cuando se usan en referencia a una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de unión se refieren a una cantidad o dosificación suficiente para producir un resultado terapéutico deseado. Más específicamente, una cantidad
20 terapéuticamente efectiva es una cantidad de una proteína aglutinante suficiente para inhibir, durante algún período de tiempo, uno o más de los procesos patológicos clínicamente definidos asociados con la condición de que se está tratando. La cantidad efectiva puede variar
25 dependiendo de la proteína de unión específica que se

está usando, y también depende de una variedad de factores y afecciones relacionadas con el paciente que se trata y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si la proteína de unión se administra in vivo, factores tales como la edad, el peso y la salud del paciente, así como las curvas de respuesta a la dosis y los datos de toxicidad obtenidos en el trabajo de animales preclínicos estarían entre aquellos factores considerados. La determinación de una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica dada está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Una modalidad de la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de unión.

Proteínas de unión anti-CD3

Ciertos aspectos de la presente descripción se relacionan con proteínas de unión que comprenden un sitio de unión al antígeno que se une a un polipéptido de CD3 (p. ej., polipéptidos de CD3 humano y de mono cynomolgus). En algunas modalidades, un dominio de unión a antígeno y/o una proteína de unión de la presente descripción “reacciona de forma cruzada” con polipéptidos CD3 humanos y de mono cynomolgus.

En algunas modalidades, las proteínas de unión descritas en la presente descripción son monoespecíficas, o biespecíficas, o triespecíficas, o multiespecíficas y/o monovalentes, bivalentes, trivalentes o multivalentes y
5 comprenden una porción de unión que se une a CD3, p. ej., a CD3 humano.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende una porción de unión que se une a CD3 humano
10 que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 160, sec. con núm. de ident.: 286 y sec. con núm. de ident.: 412; sec. con núm. de ident.: 176, sec. con núm. de ident.:
15 302 y sec. con núm. de ident.: 428; sec. con núm. de ident.: 177, sec. con núm. de ident.: 303 y sec. con núm. de ident.: 429; sec. con núm. de ident.: 178, sec. con núm. de ident.: 304 y sec. con núm. de ident.: 430; sec. con núm. de ident.: 179, sec. con núm. de ident.: 305 y
20 sec. con núm. de ident.: 431; sec. con núm. de ident.: 180, sec. con núm. de ident.: 306 y sec. con núm. de ident.: 432; sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433; sec. con núm. de ident.: 182, sec. con núm. de ident.: 308 y sec.
25 con núm. de ident.: 434; sec. con núm. de ident.: 183, sec. con núm. de ident.: 309 y sec. con núm. de ident.:

435; sec. con núm. de ident.: 184, sec. con núm. de
ident.: 310 y sec. con núm. de ident.: 436; sec. con núm.
de ident.: 185, sec. con núm. de ident.: 311 y sec. con
núm. de ident.: 437; sec. con núm. de ident.: 186, sec.
5 con núm. de ident.: 312 y sec. con núm. de ident.: 438;
sec. con núm. de ident.: 187, sec. con núm. de ident.:
313 y sec. con núm. de ident.: 439; sec. con núm. de
ident.: 188, sec. con núm. de ident.: 314 y sec. con núm.
de ident.: 440; sec. con núm. de ident.: 189, sec. con
10 núm. de ident.: 315 y sec. con núm. de ident.: 441; sec.
con núm. de ident.: 190, sec. con núm. de ident.: 316 y
sec. con núm. de ident.: 442; sec. con núm. de ident.:
191, sec. con núm. de ident.: 317 y sec. con núm. de
ident.: 443; sec. con núm. de ident.: 192, sec. con núm.
15 de ident.: 318 y sec. con núm. de ident.: 444; y sec. con
núm. de ident.: 193, sec. con núm. de ident.: 319 y sec.
con núm. de ident.: 445. En modalidades más particulares,
la porción de unión que se une a CD3 humano también
comprende un conjunto de CDR de la cadena ligera común
20 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con
núm. de ident.: 1. Más particularmente, el conjunto de
CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con
núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

25 Preferentemente, la porción de unión que se une a
CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada

que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433; sec. con núm. de ident.: 184, sec. con núm. de ident.: 310 y sec. con núm. de ident.: 436; sec. con núm. de ident.: 186, sec. con núm. de ident.: 312 y sec. con núm. de ident.: 438; sec. con núm. de ident.: 188, sec. con núm. de ident.: 314 y sec. con núm. de ident.: 440; sec. con núm. de ident.: 192, sec. con núm. de ident.: 318 y sec. con núm. de ident.: 444. Con mayor preferencia, la porción de unión que se une a CD3 humano comprende el conjunto de CDR que comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a CD3 humano también comprende un conjunto de CDR de la cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1. Más particularmente, el conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723. Con mayor preferencia, la porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433; y el conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723

En otras modalidades, la porción de unión que se une a CD3 humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 34 y 50 a 67. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a CD3 humano también comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la porción de unión que se une a CD3 humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 55, 58, 60, 62 y

66. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a CD3 humano también comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
5 aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

En ciertas modalidades, la porción de unión que
10 se une a CD3 humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la
15 sec. con núm. de ident.: 592.

En otras modalidades, la porción de unión que se une a CD3 humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos
20 seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 34 y 50 a 67. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a CD3 humano también comprende
25 una cadena ligera que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %,

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la porción de unión que se une a CD3 humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 55, 58, 60, 62 y 66; y una cadena ligera que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

La presente invención se relaciona con un anticuerpo multiespecífico, p. ej., biespecífico o triespecífico y multivalente, p. ej., bivalente o trivalente, o un fragmento de anticuerpo de este que comprende cualquiera de las porciones de unión que se unen a CD3 humano descritas anteriormente. En cualquiera de las proteínas de unión biespecíficas o triespecíficas descritas anteriormente, el antígeno diana distinto de la CD3 puede ser cualquiera de las siguientes dianas de antígeno ilustrativas: A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR,

BCMA, BIYS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como TARC), CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2), CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CCR7, CD19, CD20, CD23 (también conocido como FCER2, a receptor de IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD47, CD48, CD70, CD80 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como B7-2), CD122, CD123, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L, CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocido como PD-L2), CD274 (también conocido como PD-L1), CD275 (también conocido como B7H2), CD276 (también conocido como B7H3), CD278 (también conocido como ICOS), CD279 (también conocido como PD-1), CDH1 (también conocido como E-cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (también conocido como M-CSF), CSF-2 (también conocido como GM-CSF), CSF-3 (también conocido

como GCSF), CX3CL1 (también conocido como SCYD1), CXCL12 (también conocido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, F0LH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, GPRC5D, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNa, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1RAP, IL1LIA, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, RAP, IL9R, IL10, rILI0, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17 Rb (también conocido como un receptor de IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocido como integrina b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, KG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido como a correceptor de IL33), STEAP2, Syk quinasa, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido como un correceptor de IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM y XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1), XCL1 y XCL2. En algunas modalidades, uno o más de las dianas de antígeno anteriores son dianas de antígeno humanas. En una modalidad preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que comprende al menos dos porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano y al menos una de las cuales se une a

BCMA, preferentemente al menos dos que se unen a BCMA. En una modalidad más preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo triespecífico trivalente que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una de las cuales se une a BCMA y al menos una que se une a CD38.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoespecífico o a un fragmento de anticuerpo de este que comprende cualquiera de las porciones de unión que se unen a CD3, p. ej., a CD3 humano, descritas anteriormente.

En un aspecto particular, la presente invención se relaciona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une a CD3 humano, que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la sec. con núm. de ident.: 160, sec. con núm. de ident.: 286 y sec. con núm. de ident.: 412; sec. con núm. de ident.: 176, sec. con núm. de ident.: 302 y sec. con núm. de ident.: 428; sec. con núm. de ident.: 177, sec. con núm. de ident.: 303 y sec. con núm. de ident.: 429; sec. con núm. de ident.: 178, sec. con núm. de ident.: 304 y sec. con núm. de ident.: 430; sec. con núm. de ident.: 179, sec. con núm. de ident.: 305 y sec. con núm. de ident.: 431; sec. con núm. de ident.: 180, sec. con núm. de ident.: 306 y sec. con núm. de ident.: 432; sec. con núm. de ident.: 181, sec.

con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433;
sec. con núm. de ident.: 182, sec. con núm. de ident.: 308
y sec. con núm. de ident.: 434; sec. con núm. de ident.:
183, sec. con núm. de ident.: 309 y sec. con núm. de
5 ident.: 435; sec. con núm. de ident.: 184, sec. con núm. de
ident.: 310 y sec. con núm. de ident.: 436; sec. con núm.
de ident.: 185, sec. con núm. de ident.: 311 y sec. con
núm. de ident.: 437; sec. con núm. de ident.: 186, sec. con
núm. de ident.: 312 y sec. con núm. de ident.: 438; sec.
10 con núm. de ident.: 187, sec. con núm. de ident.: 313 y
sec. con núm. de ident.: 439; sec. con núm. de ident.: 188,
sec. con núm. de ident.: 314 y sec. con núm. de ident.:
440; sec. con núm. de ident.: 189, sec. con núm. de ident.:
315 y sec. con núm. de ident.: 441; sec. con núm. de
15 ident.: 190, sec. con núm. de ident.: 316 y sec. con núm.
de ident.: 442; sec. con núm. de ident.: 191, sec. con núm.
de ident.: 317 y sec. con núm. de ident.: 443; sec. con
núm. de ident.: 192, sec. con núm. de ident.: 318 y sec.
con núm. de ident.: 444; y sec. con núm. de ident.: 193,
20 sec. con núm. de ident.: 319 y sec. con núm. de ident.:
445; y un conjunto de CDR de cadena ligera de la cadena
ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de
la sec. con núm. de ident.: 1; en particular, el conjunto
de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de
25 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con
núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

En un aspecto preferido, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD3 humano, comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433; sec. con núm. de ident.: 184, sec. con núm. de ident.: 310 y sec. con núm. de ident.: 436; sec. con núm. de ident.: 186, sec. con núm. de ident.: 312 y sec. con núm. de ident.: 438; sec. con núm. de ident.: 188, sec. con núm. de ident.: 314 y sec. con núm. de ident.: 440; sec. con núm. de ident.: 192, sec. con núm. de ident.: 318 y sec. con núm. de ident.: 444, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

En modalidades preferidas, el anticuerpo descrito en la presente descripción, que comprende una porción de unión que se une a CD3 humano, como se describió anteriormente, es monoclonal.

Proteínas de unión anti-BCMA

Ciertos aspectos de la presente descripción se relacionan con proteínas de unión que comprenden un sitio de unión al antígeno que se une a un polipéptido de BCMA (p. ej., polipéptidos de BCMA humano y de mono

cynomolgus). En algunas modalidades, un dominio de unión a antígeno y/o una proteína de unión de la presente descripción “reacciona de forma cruzada” con polipéptidos BCMA de mono cynomolgus y humanos.

5 En algunas modalidades, las proteínas de unión descritas en la presente descripción son monoespecíficas, o biespecíficas, o triespecíficas, o multiespecíficas y/o monovalentes, bivalentes, trivalentes o multivalentes y comprenden una porción de unión que se une a BCMA, p.
10 ej., a BCMA humano.

 En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que
15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 209, sec. con núm. de ident.: 335 y sec. con núm. de ident.: 461; sec. con núm. de ident.: 210, sec. con núm. de ident.: 336 y sec. con núm. de ident.: 462; sec. con núm. de
20 ident.: 211, sec. con núm. de ident.: 337 y sec. con núm. de ident.: 463; sec. con núm. de ident.: 212, sec. con núm. de ident.: 338 y sec. con núm. de ident.: 464; sec. con núm. de ident.: 213, sec. con núm. de ident.: 339 y sec. con núm. de ident.: 465; sec. con núm. de ident.:
25 214, sec. con núm. de ident.: 340 y sec. con núm. de ident.: 466; sec. con núm. de ident.: 215, sec. con núm.

de ident.: 341 y sec. con núm. de ident.: 467; sec. con
núm. de ident.: 216, sec. con núm. de ident.: 342 y sec.
con núm. de ident.: 468; sec. con núm. de ident.: 217,
sec. con núm. de ident.: 343 y sec. con núm. de ident.:
5 469; sec. con núm. de ident.: 218, sec. con núm. de
ident.: 344 y sec. con núm. de ident.: 470; sec. con núm.
de ident.: 219, sec. con núm. de ident.: 345 y sec. con
núm. de ident.: 471; sec. con núm. de ident.: 220, sec.
con núm. de ident.: 346 y sec. con núm. de ident.: 472;
10 sec. con núm. de ident.: 221, sec. con núm. de ident.: 347
y sec. con núm. de ident.: 473; sec. con núm. de ident.:
222, sec. con núm. de ident.: 348 y sec. con núm. de
ident.: 474; sec. con núm. de ident.: 223, sec. con núm.
de ident.: 349 y sec. con núm. de ident.: 475; sec. con
15 núm. de ident.: 224, sec. con núm. de ident.: 350 y sec.
con núm. de ident.: 476; sec. con núm. de ident.: 225,
sec. con núm. de ident.: 351 y sec. con núm. de ident.:
477; sec. con núm. de ident.: 226, sec. con núm. de
ident.: 352 y sec. con núm. de ident.: 478; sec. con núm.
20 de ident.: 227, sec. con núm. de ident.: 353 y sec. con
núm. de ident.: 479; sec. con núm. de ident.: 228, sec.
con núm. de ident.: 354 y sec. con núm. de ident.: 480;
sec. con núm. de ident.: 229, sec. con núm. de ident.: 355
y sec. con núm. de ident.: 481; sec. con núm. de ident.:
25 230, sec. con núm. de ident.: 356 y sec. con núm. de
ident.: 482; sec. con núm. de ident.: 231, sec. con núm.

de ident.: 357 y sec. con núm. de ident.: 483; sec. con
núm. de ident.: 232, sec. con núm. de ident.: 358 y sec.
con núm. de ident.: 484; sec. con núm. de ident.: 233,
sec. con núm. de ident.: 359 y sec. con núm. de ident.:
5 485; sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de
ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486; y sec. con
núm. de ident.: 235, sec. con núm. de ident.: 361 y sec.
con núm. de ident.: 487. En modalidades más particulares,
la porción de unión que se une a BCMA humano también
10 comprende un conjunto de CDR de la cadena ligera común que
comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.
de ident.: 1. Más particularmente, el conjunto de CDR de
cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de
15 ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

En modalidades más particulares, la porción de
unión que se une a BCMA humano comprende un conjunto de CDR
de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de
20 ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm.
de ident.: 486; sec. con núm. de ident.: 219, sec. con núm.
de ident.: 345 y sec. con núm. de ident.: 471; sec. con
núm. de ident.: 227, sec. con núm. de ident.: 353 y sec.
con núm. de ident.: 479; sec. con núm. de ident.: 231, sec.
25 con núm. de ident.: 357 y sec. con núm. de ident.: 483.
Preferentemente, y al menos una porción de unión que se une

a BCMA humano que comprende un conjunto de CDR que comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a CD3 humano también comprende un conjunto de CDR de la cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1. Más particularmente, el conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723. Preferentemente, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486; y el conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

En otras modalidades, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 83 a 109. En

modalidades más particulares, la porción de unión que se une a BCMA humano también comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 5 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

En otras modalidades, la porción de unión que se 10 une a BCMA humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la 15 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 83 a 109, en donde las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 83 a 109 comprenden además la mutación N82aS. En modalidades más particulares, la porción de unión que se 20 une a BCMA humano también comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % 25 idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a BCMA humano también comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108, en donde las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108 comprenden además

la sustitución N82aS. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a BCMA humano también comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

En una modalidad más particular, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 591.

En otras modalidades, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 83 a 109. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a BCMA humano también comprende una cadena ligera que es al menos

aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

5 En otras modalidades, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 10 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 83 a 109, en donde las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 83 a 109 comprenden además la mutación N82aS. En modalidades más particulares, 15 la porción de unión que se une a BCMA humano también comprende una cadena ligera que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 20 de la sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 25 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la

secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108; y una cadena ligera que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 5 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la porción de unión que se une a BCMA humano comprende una región variable de cadena 10 pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que 15 comprende las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105, 108, en donde las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108 comprenden además la sustitución de aminoácido N82aS; y una cadena ligera que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 20 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

La presente invención se relaciona con un 25 anticuerpo multiespecífico, p. ej., biespecífico o triespecífico y multivalente, p. ej., bivalente o

trivalente, o a un fragmento de anticuerpo de este que comprende cualquiera de las porciones de unión que se unen a BCMA humano descrito anteriormente. En cualquiera de las proteínas de unión biespecíficas descritas anteriormente, el antígeno diana distinto de BCMA puede ser cualquiera de las siguientes dianas de antígeno ilustrativas: A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BIYS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como TARC), CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2), CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CCR7, CD19, CD20, CD23 (también conocido como FCER2, a receptor de IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD47, CD48, CD70, CD80 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como B7-2), CD122, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L, CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también

conocido como PD-L2), CD274 (también conocido como PD-
 L1), CD275 (también conocido como B7H2), CD276 (también
 conocido como B7H3), CD278 (también conocido como ICOS),
 CD279 (también conocido como PD-1), CDH1 (también
 5 conocido como E-cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91,
 CRTH2, CSF-1 (también conocido como M-CSF), CSF-2
 (también conocido como GM-CSF), CSF-3 (también conocido
 como GCSF), CX3CL1 (también conocido como SCYD1), CXCL12
 (también conocido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1,
 10 ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR,
 ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, F0LH1, Gi24, GITR, GITRL,
 GM-CSF, GPRC5D, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO,
 IFNa, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1RAP, IL1LIA, IL1B,
 IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8,
 15 IL9, RAP, IL9R, IL10, rIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2,
 IL15, IL17, IL17Rb (también conocido como un receptor de
 IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4
 (también conocido como integrina b4), ITK, KIR, LAG3,
 LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, KG2D,
 20 NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas,
 PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido
 como a correceptor de IL33), STEAP2, Syk quinasa, TACI,
 TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9,
 TMEF1, TNFa, TFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido
 25 como un correceptor de IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA,
 Vstm3, WUCAM y XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1),

XCL1 y XCL2. En algunas modalidades, uno o más de las dianas de antígeno anteriores son dianas de antígeno humanas. En una modalidad preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención
5 es un anticuerpo biespecífico trivalente que comprende al menos dos porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano y al menos una de las cuales se une a BCMA, preferentemente al menos dos que se unen a BCMA. En una modalidad más preferida, el anticuerpo de la presente
10 invención es un anticuerpo triespecífico trivalente que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una de las cuales se une a BCMA y al menos una que se une a CD38.

La presente invención también se relaciona con un
15 anticuerpo monoespecífico o a un fragmento de anticuerpo de este que comprende cualquiera de las porciones de unión que se unen a BCMA, p. ej., a BCMA humano, descrito anteriormente.

En un aspecto particular, la presente invención
20 se relaciona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une a BCMA humano, que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 209, sec. con núm. de
25 ident.: 335 y sec. con núm. de ident.: 461; sec. con núm. de ident.: 210, sec. con núm. de ident.: 336 y sec. con

núm. de ident.: 462; sec. con núm. de ident.: 211, sec.
con núm. de ident.: 337 y sec. con núm. de ident.: 463;
sec. con núm. de ident.: 212, sec. con núm. de ident.:
338 y sec. con núm. de ident.: 464; sec. con núm. de
5 ident.: 213, sec. con núm. de ident.: 339 y sec. con núm.
de ident.: 465; sec. con núm. de ident.: 214, sec. con
núm. de ident.: 340 y sec. con núm. de ident.: 466; sec.
con núm. de ident.: 215, sec. con núm. de ident.: 341 y
sec. con núm. de ident.: 467; sec. con núm. de ident.:
10 216, sec. con núm. de ident.: 342 y sec. con núm. de
ident.: 468; sec. con núm. de ident.: 217, sec. con núm.
de ident.: 343 y sec. con núm. de ident.: 469; sec. con
núm. de ident.: 218, sec. con núm. de ident.: 344 y sec.
con núm. de ident.: 470; sec. con núm. de ident.: 219,
15 sec. con núm. de ident.: 345 y sec. con núm. de ident.:
471; sec. con núm. de ident.: 220, sec. con núm. de
ident.: 346 y sec. con núm. de ident.: 472; sec. con núm.
de ident.: 221, sec. con núm. de ident.: 347 y sec. con
núm. de ident.: 473; sec. con núm. de ident.: 222, sec.
20 con núm. de ident.: 348 y sec. con núm. de ident.: 474;
sec. con núm. de ident.: 223, sec. con núm. de ident.:
349 y sec. con núm. de ident.: 475; sec. con núm. de
ident.: 224, sec. con núm. de ident.: 350 y sec. con núm.
de ident.: 476; sec. con núm. de ident.: 225, sec. con
25 núm. de ident.: 351 y sec. con núm. de ident.: 477; sec.
con núm. de ident.: 226, sec. con núm. de ident.: 352 y

sec. con núm. de ident.: 478; sec. con núm. de ident.: 227, sec. con núm. de ident.: 353 y sec. con núm. de ident.: 479; sec. con núm. de ident.: 228, sec. con núm. de ident.: 354 y sec. con núm. de ident.: 480; sec. con
5 núm. de ident.: 229, sec. con núm. de ident.: 355 y sec. con núm. de ident.: 481; sec. con núm. de ident.: 230, sec. con núm. de ident.: 356 y sec. con núm. de ident.: 482; sec. con núm. de ident.: 231, sec. con núm. de ident.: 357 y sec. con núm. de ident.: 483; sec. con núm.
10 de ident.: 232, sec. con núm. de ident.: 358 y sec. con núm. de ident.: 484; sec. con núm. de ident.: 233, sec. con núm. de ident.: 359 y sec. con núm. de ident.: 485; sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486; y sec. con núm. de
15 ident.: 235, sec. con núm. de ident.: 361 y sec. con núm. de ident.: 487; y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

20 En un aspecto más particular, la presente invención se relaciona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une a BCMA humano, que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una
25 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486; sec. con núm.

de ident.: 219, sec. con núm. de ident.: 345 y sec. con
núm. de ident.: 471; sec. con núm. de ident.: 227, sec.
con núm. de ident.: 353 y sec. con núm. de ident.: 479;
sec. con núm. de ident.: 231, sec. con núm. de ident.: 357
5 y sec. con núm. de ident.: 483, y un conjunto de CDR de
cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de
ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

En modalidades preferidas, el anticuerpo
10 descrito en la presente descripción, que comprende una
porción de unión que se une a BCMA humano, como se
describió anteriormente, es monoclonal.

Proteínas de unión anti-CD38

15 Ciertos aspectos de la presente descripción se
relacionan con proteínas de unión que comprenden un sitio
de unión al antígeno que se une a un polipéptido de CD38
(p. ej., polipéptidos de CD38 humano y de mono cynomolgus).
En algunas modalidades, un dominio de unión a antígeno y/o
20 una proteína de unión de la presente descripción “reacciona
de forma cruzada” con polipéptidos CD38 humanos y de mono
cynomolgus.

En algunas modalidades, las proteínas de unión
descritas en la presente descripción son monoespecíficas,
25 o biespecíficas, o triespecíficas, o multiespecíficas y/o
monovalentes, bivalentes, trivalentes o multivalentes y

comprenden una porción de unión que se une a CD38, p. ej., a CD38 humano.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende una
5 porción de unión que se une a CD38 humano que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 238, sec. con núm. de ident.: 364 y sec. con núm. de ident.: 490; sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec. con
10 núm. de ident.: 491; sec. con núm. de ident.: 240, sec. con núm. de ident.: 366 y sec. con núm. de ident.: 492; sec. con núm. de ident.: 241, sec. con núm. de ident.: 367 y sec. con núm. de ident.: 493; sec. con núm. de ident.: 242, sec. con núm. de ident.: 368 y sec. con núm. de ident.:
15 494; sec. con núm. de ident.: 243, sec. con núm. de ident.: 369 y sec. con núm. de ident.: 495; sec. con núm. de ident.: 244, sec. con núm. de ident.: 370 y sec. con núm. de ident.: 496; sec. con núm. de ident.: 245, sec. con núm. de ident.: 371 y sec. con núm. de ident.: 497; sec. con
20 núm. de ident.: 246, sec. con núm. de ident.: 372 y sec. con núm. de ident.: 498; sec. con núm. de ident.: 247, sec. con núm. de ident.: 373 y sec. con núm. de ident.: 499; sec. con núm. de ident.: 248, sec. con núm. de ident.: 374 y sec. con núm. de ident.: 500; sec. con núm. de ident.:
25 249, sec. con núm. de ident.: 375 y sec. con núm. de

ident.: 501; sec. con núm. de ident.: 250, sec. con núm. de
ident.: 376 y sec. con núm. de ident.: 502; sec. con núm.
de ident.: 251, sec. con núm. de ident.: 377 y sec. con
núm. de ident.: 503; sec. con núm. de ident.: 252, sec. con
5 núm. de ident.: 378 y sec. con núm. de ident.: 504; sec.
con núm. de ident.: 253, sec. con núm. de ident.: 379 y
sec. con núm. de ident.: 505; sec. con núm. de ident.: 236,
sec. con núm. de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.:
712; y sec. con núm. de ident.: 237, sec. con núm. de
10 ident.: 363 y sec. con núm. de ident.: 700. En modalidades
más particulares, la porción de unión que se une a CD38
humano también comprende un conjunto de CDR de la cadena
ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de
la sec. con núm. de ident.: 1. Más particularmente, el
15 conjunto de CDR que comprende las secuencias de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de
ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

En modalidades más particulares, la porción de
unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de
20 CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de
aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con
núm. de ident.: 236, sec. con núm. de ident.: 362 y sec.
con núm. de ident.: 712; sec. con núm. de ident.: 239,
sec. con núm. de ident.: 365 y sec. con núm. de ident.:
25 491; sec. con núm. de ident.: 237, sec. con núm. de
ident.: 363 y sec. con núm. de ident.: 700; sec. con núm.

de ident.: 248, sec. con núm. de ident.: 374 y sec. con
núm. de ident.: 500. Preferentemente, la porción de unión
que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR que
comprende la sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm.
5 de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712 o sec. con
núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec.
con núm. de ident.: 491. En modalidades más particulares,
la porción de unión que se une a CD3 humano también
comprende un conjunto de CDR de la cadena ligera común que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.
de ident.: 1. Más particularmente, el conjunto de CDR de
cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de
ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

15 En otras modalidades, la porción de unión que se
une a CD38 humano comprende una región variable de cadena
pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de
aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %,
82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la
20 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
comprende las sec. con núms. de ident.: 110 a 127. En
modalidades más particulares, la porción de unión que se
une a CD38 humano también comprende una región variable de
25 cadena ligera de una cadena ligera que comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente

80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

5 Preferentemente, la porción de unión que se une a CD38 humano comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 10 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110, 111, 113 y 122. En modalidades más particulares, la porción de unión que se une a CD38 humano también comprende una región 15 variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la 20 sec. con núm. de ident.: 1. La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las 25 cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende una

región variable de cadena pesada que comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente
85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de
5 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 593 o 594.

En otras modalidades, la porción de unión que se
une a CD38 humano comprende una cadena pesada que
comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos
10 seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de
ident.: 110 a 127. En modalidades más particulares, la
porción de unión que se une a BCMA humano también
15 comprende una cadena ligera que es al menos
aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos
de la sec. con núm. de ident.: 1.

20 Preferentemente, la porción de unión que se une a
CD38 humano comprende una región variable de cadena pesada
de una cadena pesada que comprende una secuencia de
aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la
25 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que

comprende las sec. con núms. de ident.: 110, 111, 113 y 122; y una cadena ligera que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. 5 de ident.: 1.

La presente invención se relaciona con un anticuerpo multiespecífico, p. ej., biespecífico o triespecífico y multivalente, p. ej., bivalente o 10 trivalente, o un fragmento de anticuerpo de este que comprende cualquiera de las porciones de unión que se unen a CD38 humano descritas anteriormente.

En cualquiera de las proteínas de unión triespecíficas descritas anteriormente, el antígeno diana 15 distinto de la CD38 puede ser cualquiera de las siguientes dianas de antígeno ilustrativas: A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BIYS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7- 4, C3, C5, CCL2 (también conocido como MCP-1), CCL3 20 (también conocido como MIP-1a), CCL4 (también conocido como MIP-1b), CCL5 (también conocido como RANTES), CCL7 (también conocido como MCP-3), CCL8 (también conocido como mcp-2), CCL11 (también conocido como eotaxina), CCL15 (también conocido como MIP-1d), CCL17 (también conocido como TARC), 25 CCL19 (también conocido como MIP-3b), CCL20 (también conocido como MIP-3a), CCL21 (también conocido como MIP-2),

CCL24 (también conocido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25
 (también conocido como TECK), CCL26 (también conocido como
 eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CCR7, CD19, CD20, CD23
 (también conocido como FCER2, a receptor de IgE), CD24,
 5 CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD47, CD48, CD70, CD80
 (también conocido como B7-1), CD86 (también conocido como
 B7-2), CD122, CD137 (también conocido como 41BB), CD137L,
 CD152 (también conocido como CTLA4), CD154 (también
 conocido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocido
 10 como PD-L2), CD274 (también conocido como PD-L1), CD275
 (también conocido como B7H2), CD276 (también conocido como
 B7H3), CD278 (también conocido como ICOS), CD279 (también
 conocido como PD-1), CDH1 (también conocido como E-
 cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (también
 15 conocido como M-CSF), CSF-2 (también conocido como GM-CSF),
 CSF-3 (también conocido como GCSF), CX3CL1 (también
 conocido como SCYD1), CXCL12 (también conocido como SDF1),
 CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato
 difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP,
 20 F0LH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, GPRC5D, Her2, HHLA2,
 HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFNa, IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1,
 IL1RAP, IL1LIA, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R,
 IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, RAP, IL9R, IL10, r1LI0, IL12,
 1L13, 1L13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (también
 25 conocido como un receptor de IL25), IL18, IL22, IL23, IL25,
 IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocido como integrina

b4), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC clase II, NCR3LG1, KG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROMI, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (también conocido como a correceptor de IL33), STEAP2, Syk quinasa, 5 TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocido como un correceptor de IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM y XCR1 (también conocido como GPR5/CCXCR1), XCL1 y XCL2. En algunas modalidades, uno o más de las 10 dianas de antígeno anteriores son dianas de antígeno humanas. En una modalidad preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo triespecífico trivalente que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos 15 una de las cuales se une a BCMA y al menos una que se une a CD38.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoespecífico o a un fragmento de anticuerpo de este que comprende cualquiera de las porciones de unión que 20 se unen a CD38, p. ej., a CD38 humano, descritas anteriormente.

En un aspecto particular, la presente invención se relaciona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une a BCMA humano, que comprende un conjunto de 25 CDR de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con

núm. de ident.: 238, sec. con núm. de ident.: 364 y sec.
con núm. de ident.: 490; sec. con núm. de ident.: 239, sec.
con núm. de ident.: 365 y sec. con núm. de ident.: 491;
sec. con núm. de ident.: 240, sec. con núm. de ident.: 366
5 y sec. con núm. de ident.: 492; sec. con núm. de ident.:
241, sec. con núm. de ident.: 367 y sec. con núm. de
ident.: 493; sec. con núm. de ident.: 242, sec. con núm. de
ident.: 368 y sec. con núm. de ident.: 494; sec. con núm.
de ident.: 243, sec. con núm. de ident.: 369 y sec. con
10 núm. de ident.: 495; sec. con núm. de ident.: 244, sec. con
núm. de ident.: 370 y sec. con núm. de ident.: 496; sec.
con núm. de ident.: 245, sec. con núm. de ident.: 371 y
sec. con núm. de ident.: 497; sec. con núm. de ident.: 246,
sec. con núm. de ident.: 372 y sec. con núm. de ident.:
15 498; sec. con núm. de ident.: 247, sec. con núm. de ident.:
373 y sec. con núm. de ident.: 499; sec. con núm. de
ident.: 248, sec. con núm. de ident.: 374 y sec. con núm.
de ident.: 500; sec. con núm. de ident.: 249, sec. con núm.
de ident.: 375 y sec. con núm. de ident.: 501; sec. con
20 núm. de ident.: 250, sec. con núm. de ident.: 376 y sec.
con núm. de ident.: 502; sec. con núm. de ident.: 251, sec.
con núm. de ident.: 377 y sec. con núm. de ident.: 503;
sec. con núm. de ident.: 252, sec. con núm. de ident.: 378
y sec. con núm. de ident.: 504; sec. con núm. de ident.:
25 253, sec. con núm. de ident.: 379 y sec. con núm. de
ident.: 505; sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm. de

ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712; y sec. con núm.
de ident.: 237, sec. con núm. de ident.: 363 y sec. con
núm. de ident.: 700; y un conjunto de CDR de cadena ligera
que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con
5 núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec.
con núm. de ident.: 723.

En un aspecto más particular, la presente
invención se relaciona con un anticuerpo o fragmento de
anticuerpo de este que se une a CD38 humano, que
10 comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que
comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del
grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 236, sec.
con núm. de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712;
sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.:
15 365 y sec. con núm. de ident.: 491; sec. con núm. de
ident.: 237, sec. con núm. de ident.: 363 y sec. con núm.
de ident.: 700; sec. con núm. de ident.: 248, sec. con
núm. de ident.: 374 y sec. con núm. de ident.: 500.

En modalidades preferidas, el anticuerpo
20 descrito en la presente descripción, que comprende una
porción de unión que se une a CD38 humano, como se
describió anteriormente, es monoclonal.

Anticuerpos anti-CD3 y anti-BCMA biespecíficos trivalentes

25 En ciertos aspectos, la presente invención se
relaciona con un anticuerpo biespecífico trivalente o

fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos dos porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano y al menos una de las cuales se une a BCMA, preferentemente al menos dos que se unen a BCMA.

5 En modalidades particulares de la presente invención, el anticuerpo biespecífico trivalente anti-CD3 y anti-BCMA es una inmunoglobulina heterodimérica, en particular se construye usando la tecnología de heterodimerización de cadena pesada (He) BEAT[®] descrita
10 anteriormente (Skegro et al., (2017) J Biol Chem 292(23): 9745-9759 y Stutz et al., (2020) J Biol Chem 295(28): 9392-9408, WO2012131555), comprende una cadena de BEAT (A), también denominada en la presente descripción como BTA, y la cadena de BEAT (B), también denominada en la
15 presente descripción como BTB. Más específicamente, el anticuerpo (Ab) anti-CD3 y anti-BCMA biespecífico trivalente está diseñado mediante la combinación de los aglutinantes CD3 como Fab y BCMA doble dAb de la técnica en una estructura principal BEAT Fc silenciada
20 (mutaciones LALA, Hezareh et al., 2001, J Virol, 75(24): 12161-12168).

 En ciertas modalidades de la presente invención, el anticuerpo biespecífico trivalente anti-CD3 y anti-BCMA comprende una cadena de BTA que comprende la secuencia de
25 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 515, una cadena de BTB que comprende la secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.: 516, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1; o una cadena de BTA que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 509, una cadena de BTB que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 510, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1; o una cadena de BTA que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 513, una cadena de BTB que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 514, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1; o una cadena de BTA que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 511, una cadena de BTB que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 512, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1; o una cadena de BTA que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 517, una cadena de BTB que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 518, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1. La presente invención también describe un anti-CD3 biespecífico trivalente y un anti-BCMA que comprende una cadena de BTA

y/o una cadena de BTB y/o una cadena ligera común al menos aproximadamente en un 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 99 % o 100 % idéntica a las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente.

Proteínas anti-CD3, anti-BCMA y anti-CD38 triespecíficas

La presente invención se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, también denominados en la presente descripción anticuerpos CD3/BCMA/CD38. En modalidades preferidas, la presente invención proporciona un anticuerpo triespecífico o un fragmento de anticuerpo de este que se une a un CD3 humano y a un BCMA humano, y a un CD38 humano. En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo es monoclonal. Las porciones de unión que se unen a CD3, BCMA o CD38, de acuerdo con la presente invención, se describen más arriba.

Los anticuerpos triespecíficos son un grupo de derivados de anticuerpos diseñados que reconocen tres antígenos diana diferentes. En modalidades particulares de la presente invención, el anticuerpo triespecífico anti-CD3, anti-BCMA anti-CD38 es una inmunoglobulina

heterodímera, en particular se construye usando la tecnología de anticuerpos triespecíficos TREAT® que se basa en la plataforma BEAT®. La plataforma BEAT® se basa en la sustitución de la interfaz proteína-proteína del par de dominios CH3 de la región Fc del anticuerpo por la interfaz proteína-proteína de la región constante α - β del receptor de células T (TCR). La interfaz BEAT® resultante impulsa la formación preferencial de anticuerpos biespecíficos o triespecíficos heterodiméricos (bsAbs o TriAbs) sobre los contaminantes homodiméricos. Además, los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 usan un brazo de unión Fab CD38 como unidad Fab, un brazo de unión Fab BCMA y un brazo de unión Fab CD3 que usan una cadena ligera común para evitar el apareamiento incorrecto de la cadena ligera, un desafío común asociado con las plataformas bsAb y más aún con las TriAbs. También se realizó ingeniería adicional para permitir un proceso de purificación más fácil y rápido, se mantuvo la conformación natural en la estructura del anticuerpo, la estabilidad y la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), maximizando la vida media sérica de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 (Skegro et al., J Biol Chem, 2017, 292(23):9745-9759; Stutz et al., J Biol Chem, 2020, 295(28):9392-9408).

Las porciones de unión que se unen a CD3, BCMA o CD38, de acuerdo con la presente invención, pueden ser

cualquiera de las porciones de unión que se unen a CD3, BCMA o CD38 descritas anteriormente.

En ciertas modalidades particulares, la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada seleccionado del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433; sec. con núm. de ident.: 184, sec. con núm. de ident.: 310 y sec. con núm. de ident.: 436; sec. con núm. de ident.: 186, sec. con núm. de ident.: 312 y sec. con núm. de ident.: 438; sec. con núm. de ident.: 188, sec. con núm. de ident.: 314 y sec. con núm. de ident.: 440; sec. con núm. de ident.: 192, sec. con núm. de ident.: 318 y sec. con núm. de ident.: 444.; la al menos una que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada seleccionado del grupo que comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486; sec. con núm. de ident.: 219, sec. con núm. de ident.: 345 y sec. con núm. de ident.: 471; sec. con núm. de ident.: 227, sec. con núm. de ident.: 353 y sec. con núm. de ident.: 479; sec. con núm. de ident.: 231, sec. con núm. de ident.: 357 y sec. con núm. de ident.: 483; y la al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm. de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.:

712; sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de
ident.: 365 y sec. con núm. de ident.: 491; sec. con núm.
de ident.: 237, sec. con núm. de ident.: 363 y sec. con
núm. de ident.: 700; sec. con núm. de ident.: 248, sec.
5 con núm. de ident.: 374 y sec. con núm. de ident.: 500.

Más específicamente, el anticuerpo triespecífico
de la presente invención comprende al menos una porción de
unión que se une a CD3 humano que comprende un conjunto de
CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de
10 ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm.
de ident.: 433; al menos una porción de unión que se une a
BCMA que comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que
comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm.
de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486; y al menos
15 una porción de unión que se une a CD38 humano que
comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que
comprende la sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm.
de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712 o sec. con
núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec.
20 con núm. de ident.: 491. En una modalidad preferida
particularmente, la al menos una porción de unión que se
une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena
pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la sec.
con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y
25 sec. con núm. de ident.: 491.

En cierta modalidad, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este descrito en la presente descripción comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

Aún más específicamente, la presente invención se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que

comprende la sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec. con núm. de ident.: 491, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

Aún más específicamente, la presente invención se relaciona con un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que

comprende la sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm. de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este o fragmento de unión a antígeno que se une al mismo epítipo en CD3, y/o BCMA, y/o CD38 como anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia es un anticuerpo triespecífico que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y

sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y
5 sec. con núm. de ident.: 491, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

La presente invención también se relaciona con
10 un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este o fragmento de unión a antígeno que se une al mismo epítipo en CD3, y/o BCMA, y/o CD38 como anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia es un anticuerpo triespecífico que comprende al menos tres porciones de
15 unión, al menos una de las cuales se une a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec.
20 con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha al menos una porción de unión que se
25 une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 234, sec. con

núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una
5 porción de unión que se une a CD38 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 236, sec. con núm. de ident.: 362 y sec. con núm. de ident.: 712, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.:
10 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723.

En un aspecto particular de la presente invención, el anticuerpo triespecífico comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano que
15 comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica
20 a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 55; 58; 60; 62 y 66; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
25 aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %,

96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110; 113, 122 y 111. En un aspecto más particular, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este comprende además una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

En un aspecto particular de la presente invención, el anticuerpo triespecífico comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano que comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 55; 58; 60; 62 y 66; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una región

variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 5 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108, en donde una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108 comprende además la sustitución N82aS; y al menos una porción de unión que 10 se une a CD38 humano que comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 15 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110; 113, 122 y 111. En un aspecto más particular, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este comprende además una región variable 20 de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

En un aspecto particular de la presente invención, el anticuerpo triespecífico comprende al menos 25 una porción de unión que se une a CD3 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de

aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con
5 núms. de ident.: 55; 58; 60; 62 y 66; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 10 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 15 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110; 113, 122 y 111. En un aspecto más particular, 20 el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este comprende además una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 1.

En un aspecto particular de la presente
25 invención, el anticuerpo triespecífico comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano que

comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 55; 58; 60; 62 y 66; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108, en donde una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 93, 101, 105 y 108 comprende además la sustitución N82aS; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110; 113, 122 y 111. En un aspecto más particular, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este comprende además una cadena ligera que

comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con
núms. de ident.: 1.

Más específicamente, el anticuerpo
triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la
5 presente invención comprende al menos una porción de
unión que se une a CD3 humano que comprende una región
variable de cadena pesada de una cadena pesada que
comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de
10 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 55; al menos
una porción de unión que se une a BCMA humano que
comprende una región variable de cadena pesada de una
cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
15 que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83,
84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica
a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de
20 ident.: 108; y al menos una porción de unión que se une a
CD38 humano que comprende una región variable de cadena
pesada de una cadena pesada que comprende una secuencia
de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o
25 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms.
de ident.: 110 y 113. En un aspecto más particular, el
anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de
este comprende además una región variable de cadena
5 ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia
de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

Más específicamente, el anticuerpo triespecífico
o fragmento de anticuerpo de este de la presente
invención comprende al menos una porción de unión que se
10 une a CD3 humano que comprende una región variable de
cadena pesada de una cadena pesada que comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente
80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %,
90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %
15 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la
sec. con núm. de ident.: 55; al menos una porción de
unión que se une a BCMA humano que comprende una región
variable de cadena pesada de una cadena pesada que
comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108, en donde la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de
25 ident.: 108 comprende además la mutación N82aS; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que

comprende una región variable de cadena pesada de una
cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83,
84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 5
93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica
a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
comprende las sec. con núms. de ident.: 110 y 113. En un
aspecto más particular, el anticuerpo triespecífico o
fragmento de anticuerpo de este comprende además una
10 región variable de cadena ligera de una cadena ligera que
comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con
núm. de ident.: 1.

Aún más específicamente, el anticuerpo
triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la
15 presente invención comprende al menos una porción de
unión que se une a CD3 humano que comprende una cadena
pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es
al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 20
94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:
55; al menos una porción de unión que se une a BCMA
humano que comprende una cadena pesada que comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente
25 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % idéntica a la
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 55.

99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 108; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110 y 113, preferentemente de la sec. con núm. de ident.: 113. En un aspecto más particular, el anticuerpo trispecífico o fragmento de anticuerpo de este comprende además una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108, en donde la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108 comprende además la mutación N82aS; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 110 y 113, preferentemente de la sec. con núm. de ident.: 113. En un aspecto más particular, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este comprende además una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

En una modalidad preferida, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 55; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108; y al menos una porción de

unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 113; y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con
5 núm. de ident.: 1.

En una modalidad preferida, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano que comprende una cadena
10 pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 55; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108, en donde la secuencia de
15 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108 comprende además la mutación N82aS; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 113; y una cadena ligera que comprende
20 una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

En una modalidad preferida, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención comprende al menos una porción de
25 unión que se une a CD3 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.: 55; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108; y al menos una porción de
5 unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 110; y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

10 En una modalidad preferida, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de las
15 sec. con núms. de ident.: 55; al menos una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108, en donde la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 108 comprende
20 además la mutación N82aS; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 110; y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de
25 ident.: 1.

En un aspecto más particular de la presente invención, el anticuerpo triespecífico comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano que comprende una región variable de cadena pesada que
5 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 592; al menos
10 una porción de unión que se une a BCMA humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de
15 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 591; y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
20 aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las sec. con núms. de ident.: 593 y 594, preferentemente, de
25 la sec. con núm. de ident.: 594. En un aspecto más particular, el anticuerpo triespecífico o fragmento de

anticuerpo de este comprende además una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1.

5 La presente invención también se relaciona con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a un epítipo en el CD3 humano, en donde dicho epítipo en CD3 comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 10 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 726.

 En particular, la presente invención también se relaciona con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de 15 este o fragmento de unión a antígeno que se une al mismo epítipo en CD3 humano que un anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano, una porción de unión que se une a BCMA humano y una porción de unión que 20 se une a CD38, mientras que dicho anticuerpo está unido a CD3 humano, a BCMA humano y a CD38 humano, en donde el anticuerpo de referencia es un anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este que comprende al menos tres porciones de unión, al menos una de las cuales se une 25 a CD3 humano, al menos una que se une a BCMA humano y al menos una de las cuales se une a CD38 humano, en donde

dicha al menos una porción de unión que se une a CD3 humano comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 181, sec. con núm. de ident.: 307 y sec. con núm. de ident.: 433, y un
5 conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; dicha al menos una porción de unión que se une a BCMA comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.:
10 234, sec. con núm. de ident.: 360 y sec. con núm. de ident.: 486, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec. con núm. de ident.: 723; y dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano
15 comprende un conjunto de CDR de cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 239, sec. con núm. de ident.: 365 y sec. con núm. de ident.: 491, y un conjunto de CDR de cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 721, sec. con núm. de ident.: 722 y sec.
20 con núm. de ident.: 723.

La presente invención también se relaciona con un epítipo en el CD3 humano que comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %
25 idéntica a sec. con núm. de ident.: 726.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a un epítipo en el CD38 humano, en donde dicho epítipo en CD38 comprende los residuos Glu103, Gln107, Thr114, Thr116, Arg194, Arg195, Glu198, Ala199, Asp202, Ser224, His228, Asn229, Gln231, Pro232, Glu233, Lys234, Val235, Gln236, Ile265, Ser267, Lys268, Arg269 y Asn270, como se detecta por cristalografía de rayos X. En particular, tal como se detecta mediante cristalografía de rayos X, que tiene una resolución de al menos 5 Å, preferentemente de al menos Å, aun con mayor preferencia de al menos 3,5 Å. En un ejemplo más preferido, la resolución es de aproximadamente 3,4 Å.

La presente invención también se relaciona con un epítipo de CD38 humano que comprende los residuos Glu103, Gln107, Thr114, Thr116, Arg194, Arg195, Glu198, Ala199, Asp202, Ser224, His228, Asn229, Gln231, Pro232, Glu233, Lys234, Val235, Gln236, Ile265, Ser267, Lys268, Arg269 y Asn270, detectados mediante cristalografía de rayos X. En particular, tal como se detecta mediante cristalografía de rayos X, que tiene una resolución de al menos 5 Å, preferentemente de al menos Å, aun con mayor preferencia de al menos 3,5 Å. En un ejemplo más preferido, la resolución es de aproximadamente 3,4 Å.

La presente invención también proporciona anticuerpos de longitud completa, así como fragmentos de

anticuerpos y/o porciones de unión que se unen a un CD3 humano y/o a un BCMA humano, y/o a un CD38 humano. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CHI, que incluyen Fab' y Fab'-SH, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CHI, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward ES et al., (1989) Nature, 341: 544-546) que consiste en una sola variable, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vi) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv, por sus siglas en inglés), en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird RE et al., (1988) Science 242: 423-426 ; Huston JS et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83), (vii) dímeros de Fv de cadena única biespecíficos (PCT/US92/09965), (viii) “diacuerpos” o “triacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión de genes (Tomlinson I & Hollinger P (2000) Methods Enzymol. 326: 461-79; WO94/13804; Holliger P et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-48) y (ix) scFv genéticamente fusionado al mismo anticuerpo o a un anticuerpo diferente

(Coloma MJ & Morrison SL (1997) Nature Biotechnology, 15(2): 159-163).

En ciertas modalidades de la presente invención, el anticuerpo triespecífico es un anticuerpo
5 de longitud completa o un fragmento de anticuerpo de este, en donde la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y/o la al menos una porción de unión que se une a BCMA humano y/o al menos una porción de unión que se une a CD38 humano es un fragmento de anticuerpo,
10 tal como a región Fab. Como se usan en la presente descripción, los términos “Fab” o “región Fab” o “dominio Fab” incluyen los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CHI, VL, y CL. Fab puede referirse a esta región aislada, o a esta región en el
15 contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

En cierta modalidad de la presente invención, el anticuerpo triespecífico comprende al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y al menos una porción
20 de unión que se une a BCMA humano fusionadas entre sí, o al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y al menos una porción de unión que se une a CD38 humano fusionadas entre sí, o al menos una porción de unión que se une a BCMA humano y al menos una porción de unión que
25 se une a CD38 humano fusionadas entre sí.

En una modalidad particular, el anticuerpo triespecífico tiene al menos una porción de unión que se une a BCMA humano fusionada en el extremo N al extremo C de la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano. En otra modalidad, el anticuerpo triespecífico tiene al menos una porción de unión que se une a BCMA humano fusionada en el extremo N al extremo C, dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano.

En otra modalidad, el anticuerpo triespecífico tiene al menos una porción de unión que se une a BCMA humano fusionada en el extremo C al extremo N de la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano. En una modalidad adicional, el anticuerpo triespecífico de la presente invención tiene al menos una porción de unión que se une a BCMA humano fusionada en el extremo C al extremo N, dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano.

En otra modalidad, el anticuerpo triespecífico tiene al menos una porción de unión que se une a CD3 humano fusionada en el extremo C al extremo N de la al menos una porción de unión que se une a CD38 humano. En una modalidad adicional, el anticuerpo triespecífico de la presente invención tiene al menos una porción de unión que se une a CD3 humano fusionada en el extremo N al extremo C, dicha al menos una porción de unión que se une a CD38 humano.

En un aspecto particular, las porciones de unión anteriores se fusionan entre sí a través de un enlazador, p. ej., un enlazador peptídico.

En un aspecto específico, las porciones de unión
5 del anticuerpo triespecífico de la presente invención son fragmentos Fab.

En una modalidad aún más específica, el anticuerpo de la presente invención tiene tres porciones de unión que son fragmentos Fab, en donde la porción de
10 unión que se une a BCMA humano está fusionada en el extremo C al extremo N de la cadena pesada o ligera Fab de la porción de unión que se une a CD3 humano, o en donde la porción de unión que se une a BCMA humano está fusionada en el extremo C al extremo N de la cadena
15 pesada o ligera Fab de dicha porción de unión que se une a CD38 humano.

En una modalidad aún más específica, el anticuerpo de la presente invención tiene tres porciones de unión que son fragmentos Fab, en donde la porción de
20 unión que se une a BCMA humano está fusionada en el extremo N al extremo C de la cadena pesada o ligera Fab de la porción de unión que se une a CD3 humano, o en donde la porción de unión que se une a BCMA humano está fusionada en el extremo N al extremo C de la cadena
25 pesada o ligera Fab de dicha porción de unión que se une a CD38 humano.

En un aspecto particular de la presente invención, las porciones de unión del anticuerpo fusionadas como se describió anteriormente se fusionan a través de un enlazador peptídico. Preferentemente, el enlazador tiene una secuencia seleccionada entre las sec. con núms. de ident.: 604 y 605. Otros enlazadores peptídicos preferidos se enumeran a continuación en el párrafo "Enlazadores".

Preferentemente, el anticuerpo triespecífico de acuerdo con la presente invención comprende un conjunto de tres cadenas de aminoácidos de secuencias que son al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec. con núm. de ident.: 522, sec. con núm. de ident.: 523 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 530, sec. con núm. de ident.: 531 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 532, sec. con núm. de ident.: 533 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 534, sec. con núm. de ident.: 535 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 536, sec. con núm. de ident.: 537 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 538, sec. con núm. de ident.: 539 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 540, sec. con núm. de ident.: 541 y sec. con núm. de ident.: 1;

sec. con núm. de ident.: 542, sec. con núm. de ident.:
543 y sec. con núm. de ident.: 1; sec. con núm. de
ident.: 544, sec. con núm. de ident.: 545 y sec. con núm.
de ident.: 1; sec. con núm. de ident.: 546, sec. con núm.
5 de ident.: 547 y sec. con núm. de ident.: 1; y sec. con
núm. de ident.: 548, sec. con núm. de ident.: 549 y sec.
con núm. de ident.: 1.

Preferentemente, la presente invención se
relaciona con un anticuerpo triespecífico que comprende
10 un conjunto de tres cadenas de aminoácidos que son al
menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %,
86 %, 87 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la secuencia
de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende: sec.
15 con núm. de ident.: 546, sec. con núm. de ident.: 547 y
sec. con núm. de ident.: 1; y sec. con núm. de ident.:
548, sec. con núm. de ident.: 549 y sec. con núm. de
ident.: 1.

En una modalidad más preferida, el anticuerpo
20 triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de
acuerdo con la presente invención, comprende un conjunto
de tres cadenas de aminoácidos de secuencias de
aminoácidos sec. con núm. de ident.: 546, sec. con núm.
de ident.: 547 y sec. con núm. de ident.: 1.

25

Ácidos nucleicos

Se usan metodologías estándar de ADN recombinante para construir los polinucleótidos que codifican los polipéptidos que forman las proteínas de unión, incorporar estos polinucleótidos en vectores de expresión recombina-
5 recombina- e introducir tales vectores en células huésped. Véase, p. ej., Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3.º ed.). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden realizarse de acuerdo con las
10 especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica, o como se describe en la presente descripción. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura usada en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química
15 analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritas en la presente descripción son aquellos muy conocidos y usados comúnmente en la técnica. De manera similar, las técnicas convencionales pueden usarse para síntesis química, análisis químicos,
20 preparación farmacéutica, formulación, administración y tratamiento de pacientes.

Otros aspectos de la presente descripción se relacionan con moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica
25 cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, las moléculas

de ácido nucleico aisladas comprenden una secuencia que es al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, 5 al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idénticas.

Ciertos aspectos de la presente descripción se relacionan con kits de polinucleótidos. En algunas modalidades, uno o más de los polinucleótidos es un vector 10 (p. ej., un vector de expresión). Los kits pueden encontrar uso, entre otros, para producir una o más de las proteínas de unión descritas en la presente descripción, p. ej., una proteína de unión bi o triespecífica de la presente descripción. En algunas modalidades, el kit comprende uno, 15 dos, tres, o cuatro polinucleótidos.

En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado está operativamente unido a un promotor heterólogo para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión. Un promotor puede 20 referirse a secuencias de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Una primera secuencia de ácido nucleico se enlaza operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se ubica en una relación 25 funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una

secuencia codificante de una proteína de unión si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Los ejemplos de promotores pueden incluir, pero no se limitan a, promotores obtenidos de los
5 genomas de virus (tales como el virus del polio, el virus de la viruela aviar, adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B, poliomavirus, como el Virus de los Simios 40 (SV40), y lo
10 similar), de promotores eucariotas heterólogos (tales como el promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico y similares), el potenciador temprano inmediato del citomegalovirus/promotor CAG de β -actina de pollo (Niwa et al., Gene 108(2): 193-9, 1991), el
15 promotor de quinasa fosfoglicerato (PGK), un promotor inducible por tetraciclina (Masui et al., Nucleic Acids Res. 33 :e43, 2005), el sistema lac, el sistema de punta, el sistema tac, el sistema trc, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, el promotor para la 3-
20 fosfoglicerato quinasa, los promotores de fosfatasa ácida de levadura, y el promotor de los factores alfa-apareamiento de levadura. Las proteínas de unión que codifican polinucleótidos de la presente descripción pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo, un
25 promotor inducible, o cualquier otro promotor adecuado descrito en la presente descripción u otro promotor

adecuado que un experto en la técnica reconocerá fácilmente.

En algunas modalidades, el ácido nucleico aislado se incorpora en un vector. En algunas modalidades, el vector es un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden incluir una o más secuencias reguladoras unidas operativamente al polinucleótido que se expresará. El término “secuencia reguladora” incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Los ejemplos de potenciadores adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (tales como globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, insulina y lo similar), y secuencias potenciadoras de un virus de célula eucariota (tal como potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, potenciadores de adenovirus, y lo similar). Los ejemplos de vectores adecuados pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, episomas, transposones, y vectores virales (p. ej., adenoviral, vaccinia viral, sindbis-viral, sarampión, herpes viral, lentiviral, retrovirales, vectores virales adenoasociados, etc.). Los vectores de expresión pueden usarse para transfectar células huésped, tales como, por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células

de insectos, y células de mamíferos. Los vectores de ADN viral y plásmido biológicamente funcionales capaces de expresarse y replicarse en un huésped son conocidos en la técnica y pueden usarse para transfectar cualquier célula
5 de interés.

Otros aspectos de la presente descripción se relacionan con un sistema de vector que comprende uno o más vectores que codifican una primera, segunda, tercera, y cuarta cadena de polipéptidos de cualquiera de las
10 proteínas de unión descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera cadena de polipéptidos de la proteína de unión, un segundo vector que codifica la segunda cadena de polipéptidos de la proteína
15 de unión, un tercer vector que codifica la tercera cadena de polipéptidos de la proteína de unión, y un cuarto vector que codifica la cuarta cadena de polipéptidos de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera y
20 segunda cadenas de polipéptidos de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la tercera y cuarta cadenas de polipéptidos de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera y tercera cadenas de
25 polipéptidos de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la segunda y la cuarta cadenas de polipéptidos

de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera y la cuarta cadenas de polipéptidos de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la segunda y tercera cadenas de polipéptidos de la proteína de unión. En algunas modalidades, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas de polipéptidos de la proteína de unión. El uno o más vectores del sistema de vectores pueden ser cualquiera de los vectores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el uno o más vectores son vectores de expresión.

Células huésped aisladas

Otros aspectos de la presente descripción se relacionan con una célula huésped aislada que comprende uno o más polinucleótidos, kits de polinucleótidos, vectores y/o sistemas de vectores aislados descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la célula huésped es una célula bacteriana (p. ej., una célula de *E. coli*). En algunas modalidades, la célula huésped es una célula de levadura (p. ej., una célula de *S. cerevisiae*). En algunas modalidades, la célula huésped es una célula de insecto. Los ejemplos de células hospedantes de insectos pueden incluir, p. ej., células de *Drosophila* (p. ej., células S2), células de

Trichoplusia ni (p. ej., células High Five™) y células de Spodoptera frugiperda (p. ej., células Sf21 o Sf9). En algunas modalidades, la célula huésped es una célula de mamífero. Los ejemplos de células huésped de mamíferos pueden incluir, por ejemplo, células renales embrionarias humanas (p. ej., células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, y sus variantes 293T), células Expi293™, células CHO, células renales de cría de hámster (p. ej., BHK, ATCC CCL 10), células de Sertoli de ratón (p. ej., células TM4), células renales de mono (p. ej., CV1 ATCC CCL 70), células renales de mono verde africano (p. ej., VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (p. ej., HELA, ATCC CCL 2), células renales caninas (p. ej., MDCK, ATCC CCL 34), células hepáticas de rata búfalo (p. ej., BRL 3A, ATCC CRL 1442), células pulmonares humanas (p. ej., W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (p. ej., Hep G2, HB 8065), células tumorales mamarias de ratón (p. ej., MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI, células MRC 5, células FS4, una línea de hepatoma humano (p. ej., Hep G2) y células de mieloma (p. ej., células NS0 y Sp2/0).

Otros aspectos de la presente descripción se relacionan con un método para producir cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, el método incluye a) cultivar una célula huésped (p. ej., cualquiera de las células huésped

descritas en la presente descripción) que comprende un ácido nucleico aislado, vector, y/o sistema de vector (p. ej., cualquiera de los ácidos nucleicos, vectores, y/o sistemas de vectores aislados descritos en la presente descripción) en condiciones tales que la célula huésped expresa la proteína de unión; y b) aislar la proteína de unión de la célula huésped.

Los métodos de cultivo de células huésped en condiciones para expresar una proteína son muy conocidos por un experto en la técnica. El cultivo celular es un proceso en el que las células se cultivan en condiciones controladas en un entorno artificial. Los términos “cultivo celular” o “cultivo” o “cultivo de células huésped” se refieren al crecimiento y/o propagación y/o mantenimiento de células en condiciones artificiales controladas. Las condiciones óptimas de cultivo se obtienen mediante el control y ajuste de varios parámetros, entre ellos: la formulación del medio de cultivo celular, los parámetros de funcionamiento del biorreactor, la modalidad de suministro de nutrientes y el período de tiempo de cultivo. La formulación del medio de cultivo está optimizada para favorecer la vitalidad y reproducción celular; Los ejemplos de componentes del medio de cultivo celular incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos esenciales, sales, glucosa, factores de crecimiento y antibióticos. Los parámetros importantes de

funcionamiento del biorreactor son: temperatura, pH, velocidad de agitación, niveles de oxigenación y dióxido de carbono. Los nutrientes se pueden suministrar de diferentes maneras: en el cultivo en modo discontinuo, todos los nutrientes necesarios están presentes en el medio base inicial y se usan hasta que se agotan mientras se acumulan los desechos; en el cultivo discontinuo se suministra medio de alimentación adicional para evitar el agotamiento de nutrientes y prolongar el cultivo; De manera diferente, en la modalidad de perfusión, las células en cultivo se complementan continuamente con medio fresco que contiene nutrientes que fluye en el biorreactor eliminando los desechos celulares. Una persona experta comprenderá que el período de cultivo es importante, ya que debe ser lo suficientemente largo para permitir que las células produzcan una cantidad constante de producto, pero no puede ser demasiado largo para perjudicar la viabilidad celular.

Los métodos para aislar proteínas de células huésped cultivadas son bien conocidos por una persona experta en la técnica, incluyendo, por ejemplo, técnicas de cromatografía. El término “cromatografía” se refiere a la operación de separar compuestos de una mezcla en función de su capacidad para interactuar con una fase estacionaria de una resina cromatográfica, de la que pueden retenerse o eluirse. Las técnicas de cromatografía

son conocidas en la técnica, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico separa iones y moléculas polares en función de su diferencia de cargas; ejemplos de técnicas de cromatografía de intercambio iónico son la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de intercambio aniónico. La cromatografía de afinidad se basa en la interacción específica de la proteína con un ligando inmovilizado. Ejemplos no limitantes de ligandos que son útiles para la purificación de un anticuerpo por cromatografía de afinidad son la proteína A y la proteína G. La proteína A es una proteína de la pared celular aislada de *Staphylococcus aureus*, que tiene la propiedad de unirse a la inmunoglobulina Fc (y no unirse al sitio de unión del antígeno). En la presente descripción, el término “cromatografía de proteína A” se refiere a una cromatografía de afinidad en la que el ligando que se une al anticuerpo es la proteína A, donde el término “proteína A” incluye proteína A nativa, proteína A recombinante y análogos o derivados de estas. Tanto los análogos como los derivados de proteínas conservan su actividad de unión a los anticuerpos (p. ej., IgG Fc). La proteína G es una proteína de la pared celular aislada del estreptococo tipo G, y su parte N-terminal es el dominio de unión de la albúmina, y su parte C-terminal es el dominio de unión de IgG y el dominio de unión de la

pared celular. En la presente descripción, el término “cromatografía de proteína G” se refiere a una cromatografía de afinidad en la que el ligando que se une al anticuerpo es la proteína G, donde el término “proteína G” incluye proteína G nativa, proteína G recombinante y análogos o derivados de estas. Los métodos para aislar proteínas de células huésped cultivadas pueden incluir una etapa de cromatografía de afinidad (como cromatografía de afinidad de proteína A) seguido de una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión por tamaño.

Arquitectura de anticuerpos

En ciertas modalidades de la presente invención, las porciones de unión del anticuerpo trispecífico o fragmento de anticuerpo de este están fusionadas (es decir, conectadas entre sí) entre sí. En modalidades particulares, la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y la al menos una porción de unión que se une a BCMA humano, o la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y la al menos una porción de unión que se une a CD38 humano, o la al menos una porción de unión que se une a BCMA humano y la al menos una porción de unión que se une a CD38 humano, están fusionadas entre sí. En modalidades más particulares, la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y la al menos una porción de unión que se une a

BCMA humano, o la al menos una porción de unión que se une a CD3 humano y la al menos una porción de unión que se une a CD38 humano, o la al menos una porción de unión que se une a BCMA humano y la al menos una porción de unión que se une a CD38 humano, se fusionan entre sí a través de un enlazador, p. ej., un enlazador peptídico.

En ciertas modalidades, la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo N al extremo C de la porción de unión que se une a CD3 humano.

10 En otras modalidades, la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo N al extremo C de la porción de unión que se une a CD38 humano. En otras modalidades, la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de

15 unión que se une a CD3 humano. En otras modalidades, la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de unión que se une a CD38 humano.

En ciertas modalidades, la porción de unión que se une a CD3 humano se fusiona en el extremo N al extremo C de la porción de unión que se une a BCMA humano. En otras modalidades, la porción de unión que se une a CD3 humano se fusiona en el extremo N al extremo C de la porción de unión que se une a CD38 humano. En otras

25 modalidades, la porción de unión que se une a CD3 humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de

unión que se une a BCMA humano. En otras modalidades, la porción de unión que se une a CD3 humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de unión que se une a CD38 humano.

5 En ciertas modalidades, la porción de unión que se une a CD38 humano se fusiona en el extremo N al extremo C de la porción de unión que se une a BCMA humano. En otras modalidades, la porción de unión que se une a CD38 humano se fusiona en el extremo N al extremo C
10 de la porción de unión que se une a CD3 humano. En otras modalidades, la porción de unión que se une a CD38 humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de unión que se une a BCMA humano. En otras modalidades, la porción de unión que se une a CD38 humano se fusiona en
15 el extremo C al extremo N de la porción de unión que se une a CD3 humano.

 En modalidades preferidas, la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo N al extremo C de la porción de unión que se une a CD3 humano, o
20 la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de unión que se une a CD38 humano.

 En modalidades preferidas, las porciones de unión conectadas como se describió anteriormente se fusionan
25 entre sí a través de un enlazador, p. ej., un enlazador peptídico.

En modalidades preferidas, la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo N al extremo C de la porción de unión que se une a CD3 humano a través de un enlazador peptídico, o la porción de unión
5 que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de unión que se une a CD38 humano a través de un enlazador peptídico.

En modalidades aún más preferidas, la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo N
10 al extremo C de la porción de unión que se une a CD3 humano a través de un enlazador peptídico de la sec. con núm. de ident.: 605, o la porción de unión que se une a BCMA humano se fusiona en el extremo C al extremo N de la porción de unión que se une a CD38 humano a través de un enlazador
15 peptídico de la sec. con núm. de ident.: 604.

En modalidades particulares de la presente invención, las porciones de unión del anticuerpo descrito en la presente descripción son un fragmento de anticuerpo seleccionado de la lista no limitante mencionada
20 anteriormente de “fragmentos de anticuerpo”. En una modalidad más particular, la porción de unión que se une a CD3 humano y/o la porción de unión que se une a BCMA humano y/o la porción de unión que se une a CD38 humano es un dominio Fab.

25 En cierta modalidad, el anticuerpo de la presente invención comprende un dominio Fc y al menos

tres porciones de unión. En modalidades más particulares, al menos una primera porción de unión está fusionada en el extremo N al extremo C de una segunda porción de unión. En ciertos aspectos, la primera porción de unión, 5 p. ej., un dominio Fab, que se encuentra entre el dominio Fc del anticuerpo y la segunda porción de unión, p. ej., un segundo dominio Fab, se denomina “Fc proximal”, mientras que la segunda porción de unión se denomina “Fc distal”.

10 En una modalidad particular, la segunda porción de unión, p. ej., una porción de unión distal de Fc, se fusiona al extremo N del dominio VH (pesado variable) de la primera porción de unión, p. ej., una porción de unión proximal de Fc.

15 En modalidades preferidas, la porción de unión que se une a CD38 es Fc proximal y la porción de unión que se une a CD3 o a la porción de unión que se une a BCMA es Fc distal; preferentemente la porción de unión que se une a CD38 es proximal y la porción de unión que 20 se une a BCMA es Fc distal. En una modalidad preferida, la porción de unión que se une a BCMA es Fc proximal y la porción de unión que se une a CD3 o la porción de unión que se une a CD38 es Fc distal; con mayor preferencia, la porción de unión que se une a BCMA es Fc proximal a la 25 porción de unión que se une a CD3 es Fc distal.

En modalidades particulares de la presente invención, el anticuerpo triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención comprende tres porciones de unión, una que se une a CD3 humano, una
5 que se une a BCMA humano y una que se une a CD38 humano, dichas tres porciones de unión son fragmentos Fab, y el anticuerpo se construye usando la tecnología de anticuerpos triespecíficos TREAT® que se basa en la plataforma BEAT® como se describió anteriormente. En una
10 modalidad particular, la porción de unión que se une a BCMA humano y la porción de unión que se une a CD38 humano están ubicadas en el mismo brazo del anticuerpo BEAT, más en particular, la porción de unión que se une al brazo de unión de BCMA humano está en la posición
15 distal de Fc, y la porción de unión que se une a CD38 humano está en la posición proximal de Fc. En una modalidad más particular, la porción de unión que se une a BCMA humano y la porción de unión que se une a CD38 humano se fusionan a través de un enlazador flexible; que
20 comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 604. En una modalidad particular preferida, la porción de unión que se une a CD3 humano y la porción de unión que se une a BCMA humano están ubicadas en el mismo brazo del anticuerpo BEAT, más
25 en particular, la porción de unión que se une al brazo de unión de CD3 humano está en la posición distal de Fc, y

la porción de unión que se une a BCMA humano está en la posición proximal de Fc. En una modalidad más particular, la porción de unión que se une a CD3 humano y la porción de unión que se une a BCMA humano se fusionan a través de un enlazador flexible; que comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 605.

Enlazadores

En algunas modalidades, los enlazadores de la presente invención, p. ej., L1, L2, L3 y L4 varían desde ningún aminoácido (longitud=0) a aproximadamente 100 aminoácidos largos, o menos de 100, 50, 40, 30, 20, o 15 aminoácidos o menos. Los enlazadores también pueden ser 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácido de largo. L1, L2, L3 y L4 en una proteína de unión pueden tener todas las mismas secuencias de aminoácidos o pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos.

Los ejemplos de enlazadores adecuados incluyen un único residuo de glicina (Gly); un péptido de diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro residuos de glicina; un péptido con cinco residuos de glicina; un péptido con seis residuos de glicina; un péptido con siete residuos de glicina; y un péptido con ocho residuos de glicina. Se pueden usar otras combinaciones de residuos de aminoácidos como el

péptido GGGT, o el GGGGS, o repeticiones de dichos péptidos, como el péptido GGGGS GGGGS GGGGS. En una modalidad preferida, el enlazador de la presente invención que une diferentes porciones de unión tiene una
5 secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 604 o 605 o una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 604 o 605 que comprende una o más sustituciones conservadoras de esta.

Los ejemplos enumerados anteriormente no
10 pretenden limitar el alcance de la descripción de ninguna manera, y se ha demostrado que los enlazadores que comprenden aminoácidos seleccionados aleatoriamente del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato,
15 glutamato, asparagina, glutamina, glicina, y prolina son adecuadas en las proteínas de unión. Para descripciones adicionales de secuencias enlazadoras, ver, p. ej., la patente núm. WO2012135345 y la solicitud internacional núm. PCT/US2017/027488.

20 La identidad y la secuencia de los residuos de aminoácidos en el enlazador pueden variar según el tipo de elemento estructural secundario necesario para lograr en el enlazador. Por ejemplo, la glicina, la serina y la alanina son mejores para los enlazadores que tienen
25 máxima flexibilidad. Alguna combinación de glicina, prolina, treonina, y serina son útiles si es necesario un

enlazador más rígido y prolongado. Cualquier residuo de aminoácido puede considerarse como un enlazador en combinación con otros residuos de aminoácidos para construir enlazadores peptídicos más grandes según sea necesario en función de las propiedades deseadas.

Regiones Fc y dominios constantes

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo triespecífico que comprende una región Fc.

10 En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende un fragmento de anticuerpo, que incluye, entre otros, fragmentos de anticuerpo Fab, (Fab')₂, Fab'-SH, Fv, o scFv. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente

15 descripción comprende un fragmento de anticuerpo, que incluye, pero no se limita a, fragmentos de anticuerpo Fab, (Fab')₂, Fab'-SH, Fv, o scFv, que comprende una región Fc.

En algunas modalidades, una proteína de unión de

20 la presente descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo de longitud completa o una cadena de polipéptidos que comprende una región Fc. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc humana, p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana. En

25 algunas modalidades, la región Fc incluye una bisagra de anticuerpo, dominios CH1, CH2, CH3, y opcionalmente CH4.

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG2 humana. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG3 humana; en algunas
5 modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana. En algunas modalidades, la región Fc incluye una o más de las mutaciones descritas en la presente descripción.

En cierta modalidad, el anticuerpo triespecífico
10 o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención comprende un dominio Fc que no ocurre naturalmente.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción incluye una o dos variantes de Fc. El término “variante de Fc”, como se usa en la presente
15 descripción, se relaciona con una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc nativo, pero aún comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor de Fc neonatal). Las variantes de Fc ilustrativas y su interacción con el receptor de rescate,
20 son conocidas en la técnica. Por lo tanto, el término “variante de Fc” puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que pueden eliminarse porque proporcionan características
25 estructurales o actividad biológica que no se requieren para las proteínas de unión similares a anticuerpos de la

invención. Por lo tanto, el término “variante de Fc” comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos Fc nativos, o en los que se modifica uno o más sitios Fc o residuos, que afectan o están involucrados en: (1) formación de puentes disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor Fc distinto de un receptor de rescate, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término “anticuerpo parental” o “inmunoglobulina parental” como se usa en la presente descripción, incluye un anticuerpo no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho anticuerpo parental puede ser un anticuerpo de origen natural, un anticuerpo de origen no natural, o una variante o versión diseñada por ingeniería genética de un anticuerpo de origen natural. El anticuerpo parental puede referirse al anticuerpo en sí mismo, composiciones que comprenden el anticuerpo parental, o la secuencia de aminoácidos que la codifica. En modalidades preferidas de la presente invención, el anticuerpo parental comprende una región Fc. Más específicamente, la región Fc del anticuerpo parental de acuerdo con la presente invención es una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana; en algunas modalidades, la

región Fc del anticuerpo parental de acuerdo con la presente invención es una región Fc de IgG1 modificada o no modificada.

En modalidades particulares, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo heterodimérico o un fragmento de anticuerpo de este con un Fc diseñado que comprende un primer y un segundo dominio CH3 diseñado, en donde dicho primer dominio CH3 diseñado comprende las sustituciones que favorecen la heterodimerización. En modalidades particulares de la presente invención, el anticuerpo se construye usando la tecnología de heterodimerización de cadena pesada (He) de BEAT® descrita previamente (Skegro et al., (2017) J Biol Chem 292(23): 9745-9759 y Stutz et al., (2020) J Biol Chem 295(28): 9392-9408, WO2012131555), en donde la cadena BEAT(A) también se denomina en la presente descripción BEAT(A) y comprende un primer dominio CH3 diseñado, y la cadena BEAT (B) también se denomina en la presente descripción BEAT(B) y comprende un segundo dominio CH3 diseñado.

En una modalidad más particular, el primer dominio CH3 diseñado comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que comprende: Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N (numeración de UE); y dicho segundo dominio CH3 diseñado comprende las sustituciones del grupo que comprende: Q347E, Y349A, L351F,

S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R (numeración de UE); En aspectos específicos, la inmunoglobulina heterodímera o el fragmento heterodímero se heterodimerizan a través de dichos primer y segundo
5 dominios CH3 diseñados.

En una modalidad más particular, la presente invención divulga un anticuerpo triespecífico o un fragmento de anticuerpo de este construido con base en la plataforma BEAT®, en donde el dominio CH3 de BEAT(A)
10 comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que comprende: Q347A, S364K, T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N (numeración de UE) y opcionalmente BEAT(A) comprende además sustituciones seleccionadas del grupo que comprende D356E, L358M, N384S, V397M, V422I,
15 H435R e Y436F (numeración de UE); y el dominio CH3 BEAT(B) comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que comprende: Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L, D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R (numeración de UE) y, opcionalmente, BEAT(b) comprende además la
20 sustitución D401Q (numeración de UE).

En ciertos aspectos, la presente invención también se relaciona con un anticuerpo heterodimérico triespecífico o un fragmento de anticuerpo de este que comprende un primer y un segundo dominio CH3 diseñado, en
25 donde dicho primer dominio CH3 diseñado comprende las sustituciones del grupo que comprende: Q347A, S364K,

T366V, K370T, K392Y, F405S, Y407V, K409W, T411N
(numeración de UE), y el segundo dominio CH3 diseñado
comprende las sustituciones del grupo que comprende:
Q347E, Y349A, L351F, S364T, T366V, K370T, T394D, V397L,
5 D399E, F405A, Y407S, K409R, T411R (numeración de UE), y
en donde la inmunoglobulina heterodímera triespecífica o
fragmento heterodímero se heterodimeriza a través de los
primer y segundo dominios CH3 diseñados, caracterizado
porque dicho anticuerpo heterodímero triespecífico o
10 fragmento de anticuerpo de este comprende al menos tres
porciones de unión, cada porción de unión que se une a un
antígeno diferente.

En ciertos aspectos, el anticuerpo biespecífico
de la presente invención comprende una región Fc variante
15 que comprende al menos una modificación de aminoácidos en
relación con la región Fc del anticuerpo parental, mientras
que el anticuerpo que comprende la variante de región Fc
exhibe una función efectora alterada en comparación con el
anticuerpo parental. Más específicamente, el dominio CH2 de
20 la región Fc comprende al menos una modificación de
aminoácidos.

En modalidades particulares de la presente
invención, BEAT(A) y BEAT(B) se han diseñado para
aumentar la función efectora Fc. Más específicamente, el
25 dominio CH2 de la región Fc se ha diseñado por ingeniería
genética para comprender al menos una modificación de

aminoácidos. Más específicamente, el BEAT(A) comprende una o más sustituciones en una posición seleccionada del grupo que comprende: 324, 334, 269, 298, 239, 332 y 333; y BEAT(B) comprende una o más sustituciones en una
5 posición seleccionada del grupo que comprende: 324, 334, 269, 298, 239, 332 y 333; preferentemente, comprende 324, 334, 269, 289, 298, 333. Aún más específicamente, el BEAT(A) comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que comprende: S324N, K334E, K334A, E269D,
10 S298A, S239D, I332E y E333A; y BEAT(B) comprende una o más sustituciones en una posición seleccionada del grupo que comprende: S324N, K334E, K334A, E269D, S289A, K334A, E333A. En ciertas modalidades particulares, BEAT(A) comprende un conjunto de mutaciones seleccionadas del
15 grupo que comprende: S324N; o S324N y K334E; o E269D, S298A, S324N y K334A; o S239D, I332E y S324N; o E269D, S298A, S324N y E334A; o S298A, S324N y E333A; o S298A, S324N y K334A; o S324N, S298A, E269D y E333A; o S324N, S298A, E269D y K334A. En otras modalidades particulares,
20 BEAT(B) comprende un conjunto de mutaciones seleccionadas del grupo que comprende: S324N; o S324N y K334E; o E269D, S298A, S324N y K334A; o S239D, I332E y S324N; o E269D; o E269D, S298A, S324N y E334A; o S298A, S324N y E333A; o S298A, S324N y K334A; o S324N, S298A, E269D y E333A; o
25 S324N, S298A, E269D y K334A. En ciertas modalidades preferidas, BEAT(A) y BEAT(B) comprenden la mutación

S324N; o las mutaciones S324N y K334E; o las mutaciones E269D, S298A, S324N y K334A; o las mutaciones E269D, S298A, S324N y E334A; o las mutaciones S298A, S324N y E333A; o las mutaciones S298A, S324N y K334A; o las mutaciones S324N y K334E. En modalidades particularmente preferidas, el BEAT(A) comprende las mutaciones S239D, I332E y S324N, y BEAT(B) comprende la mutación S324N.

En algunas modalidades, la región Fc comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión del receptor Fc y/o la función efectora de la región Fc (p. ej., fagocitosis celular dependiente de anticuerpos mediada por el receptor Fc (ADCP, por sus siglas en inglés), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, y/o 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y/o P329A. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 298, 299 y/o 300 de IgG1 humana de acuerdo con el índice

EU. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A, y/o Y300S.

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a Fcγ1 y/o Fcγ11. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a Fcγ1 y/o Fcγ11, pero no afectan la unión a FcRn. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228 y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S228P y /o R409K. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 234 y/o 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son F234A y/o L235A. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 228, 234, 235, y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, y /o R409K. En algunas modalidades, la región Fc es una región

Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones que corresponden a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una eliminación en 236. En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende mutaciones de aminoácidos en las sustituciones correspondientes a las posiciones 228, 233-236, y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, las mutaciones de aminoácidos son S228P; E233P, F234V, L235A, y una delección en 236; y/o R409K.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para mejorar la purificación, p. ej., mediante la modulación de la afinidad por un reactivo de purificación. Por ejemplo, se sabe que las proteínas de unión heterodiméricas pueden purificarse selectivamente de sus formas homodiméricas si una de las dos regiones Fc de la forma heterodimérica contiene una mutación(es) que reduce(n) o elimina(n) la unión a la proteína A, porque la forma heterodimérica tendrá una afinidad intermedia por la purificación basada en la proteína A que cualquier forma homodimérica y puede eluirse selectivamente de la proteína A, p. ej., usando un pH diferente (ver, p. ej., Smith, EJ. et al. (2015) Sci. Rep. 5: 17943). En algunas

modalidades, la mutación comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R y Y436F. En

5 algunas modalidades, la proteína de unión comprende una segunda cadena de polipéptidos que comprende además una primera región Fc enlazada a CH1, la primera región Fc comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina

10 CH2 y CH3, y una tercera cadena de polipéptidos comprende además una segunda región Fc enlazada a CH1, la segunda región Fc comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3; y en donde solo una de la primera y la segunda

15 regiones Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R y Y436F.

Para mejorar los rendimientos de algunas

20 proteínas de unión (p. ej., proteínas de unión biespecíficas o triespecíficas), los dominios CH pueden alterarse mediante la tecnología BEAT que se describe en detalle con varios ejemplos en y en la publicación internacional núm. WO2012131555.

25 En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para

mejorar la vida útil del suero (ver, p. ej., Hinton, P R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346-56). En algunas modalidades, la mutación comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende una segunda cadena de polipéptidos que comprende además una primera región Fc enlazada a CH1, la primera región Fc comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3, y una tercera cadena de polipéptidos comprende además una segunda región Fc enlazada a CH1, la segunda región Fc comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3, en donde las primera y/o segunda regiones Fc comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende mutaciones de perilla y ojal y una o más mutaciones para mejorar la vida útil del suero. En algunas modalidades, las regiones Fc primera y/o segunda son regiones Fc IgG1 humanas.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción comprende una o más mutaciones para reducir la función efectora, p. ej., fagocitosis celular dependiente del anticuerpo mediada por el receptor Fc (ADCP), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas modalidades, la segunda cadena de polipéptidos comprende además una primera región Fc enlazada a CH1, la primera región Fc comprende un dominio bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3; en donde la tercera cadena de polipéptidos comprende además una segunda región Fc enlazada a CH1, la segunda región Fc comprende un dominio bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3; en donde las primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humanas; y en donde las regiones Fc primera y segunda comprende cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A y L235A. En algunas modalidades, las regiones Fc de la segunda y tercera cadenas de polipéptidos son regiones Fc de IgG1 humana, y en donde las regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG1 humana de acuerdo con el

índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A y L235A. En algunas modalidades, la segunda cadena de polipéptidos comprende además una primera región Fc enlazada a CH1, la primera región Fc comprende un dominio 5 bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3; en donde la tercera cadena de polipéptidos comprende además una segunda región Fc enlazada a CH1, la segunda región Fc comprende un dominio bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de 10 cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3; en donde las primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humanas; y en donde las regiones Fc primera y segunda comprende cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, y 15 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y P329A. En algunas modalidades, las regiones Fc de la segunda y tercera cadenas de polipéptidos son regiones Fc de IgG1 humana, y en donde las regiones Fc comprenden, cada una, 20 sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 234, 235, y 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y P329A. En algunas modalidades, las regiones Fc de la segunda y 25 tercera cadenas de polipéptidos son regiones Fc IgG4 humanas, y las regiones Fc comprenden cada una

sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A. En algunas modalidades, la

5 proteína de unión comprende una segunda cadena de polipéptidos que comprende además una primera región Fc enlazada a CH1, la primera región Fc comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3, y una tercera cadena

10 de polipéptidos comprende además una segunda región Fc enlazada a CH1, la segunda región Fc comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3; y en donde las regiones Fc primera y segunda comprende cada una

15 sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A.

En algunas modalidades, una proteína de unión de

20 la presente descripción comprende mutaciones de botón y ojal y una o más mutaciones para reducir la función efectora. En algunas modalidades, las regiones Fc primera y/o segunda son regiones Fc IgG1 humanas. En algunas modalidades, las regiones Fc primera y/o segunda son

25 regiones Fc IgG4 humanas. Para una descripción adicional de las mutaciones Fc en la posición 329, ver, p. ej.,

Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604 y
WO 1999051642.

En una modalidad específica, el anticuerpo
triespecífico o fragmento de anticuerpo de este de acuerdo
5 con la presente invención comprende un dominio Fc de origen
no natural que comprende sustituciones
L234A/L235A(LALA)/P329A en el dominio CH2. Más en
particular, el anticuerpo triespecífico o fragmento de
anticuerpo de este descrito en la presente descripción
10 puede comprender un Fc, en donde el Fc puede comprender un
primer y un segundo dominio CH3 BEAT como se describió
anteriormente, o dominios CHE de origen natural, o como se
describió anteriormente, o cualquier otro dominio CH3 y CH2
de origen no natural que comprenda sustituciones
15 L234A/L235A(LALA)/P329A.

Aplicación de la proteína de unión

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este
de la presente invención puede emplearse en cualquier
20 método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión
competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos y
ensayos de inmunoprecipitación para la detección y
cuantificación de uno o más antígenos diana. Las proteínas
de unión unirán el uno o más antígenos diana con una
25 afinidad que es adecuada para el método de ensayo que se
emplea.

Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas modalidades, las proteínas de unión pueden etiquetarse con una entidad detectable. La entidad detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la entidad detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In o ^{67}Ga ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, p-galactosidasa, o peroxidasa de rábano.

Las proteínas de unión también son útiles para la formación de imágenes in vivo. Una proteína de unión etiquetada con una porción detectable puede administrarse a un animal, preferentemente en el torrente sanguíneo, y la presencia y ubicación del anticuerpo etiquetado en el huésped que se analiza. La proteína de unión puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología u otros medios de detección conocidos en la técnica.

Para aplicaciones clínicas o de investigación, en ciertas modalidades, las proteínas de unión pueden conjugarse con un agente citotóxico. Una variedad de anticuerpos acoplados a agentes citotóxicos (es decir, conjugados anticuerpo-fármaco) se ha usado para dirigir

cargas citotóxicas a células tumorales específicas. Los agentes y enlazadores citotóxicos que conjugan los agentes a un anticuerpo se conocen en la técnica; ver, p. ej., Parslow, A.C. et al. (2016) Biomedicines 4: 14 and
5 Kalim, M. et al. (2017) Drug Des. Devel. Ther. 11 :2265-2276.

La descripción también se refiere a un kit que comprende una proteína de unión y otros reactivos útiles para detectar niveles de antígeno diana en muestras
10 biológicas. Tales reactivos pueden incluir una etiqueta detectable, bloqueo de suero, control positivo y negativo de muestras, y reactivos de detección. En algunas modalidades, el kit comprende una composición que comprende cualquier proteína de unión, polinucleótido,
15 vector, sistema de vector y/o célula huésped descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto insertado sobre o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas,
20 frascos, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición efectiva para tratar, prevenir y/o
25 diagnosticar una afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una

bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). En algunas modalidades, la etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para prevenir, 5 diagnosticar y/o tratar la condición de elección. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación o kit puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un regulador farmacéuticamente aceptable, tal como agua 10 bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros reguladores, diluyentes, 15 filtros, agujas y jeringas.

En algunas modalidades, una proteína de unión de la presente descripción se administra a un paciente que lo necesita para el tratamiento o la prevención del cáncer. En algunas modalidades, la presente descripción 20 se relaciona con un método para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno proliferativo (p. ej., cáncer). En algunas modalidades, el método comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo heterodimérico, o composiciones farmacéuticas 25 relacionadas con este, descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, la presente

descripción se relaciona con usos del anticuerpo heterodimérico, o composiciones farmacéuticas relacionadas con estos, descritas en la presente descripción para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno proliferativo (p. ej., cáncer) en un paciente que lo necesita. En algunas modalidades, la presente descripción se refiere al anticuerpo heterodimérico, o composiciones farmacéuticas relacionadas con este, descritas en la presente descripción para su uso en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno proliferativo (p. ej., cáncer) en un paciente que lo necesite. En algunas modalidades, el paciente es un ser humano. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un sitio de unión al antígeno que une una proteína de superficie de las células T y otro sitio de unión al antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido de CD38 humano. En algunas modalidades, la proteína de unión comprende un sitio de unión al antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido de CD38 humano, un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido de CD3 humano y un sitio de unión al antígeno que se une a un polipéptido de BCMA humano.

En ciertas modalidades, el cáncer es un cáncer que expresa BCMA y/o un cáncer que expresa CD38. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, mieloma

múltiple, leucemia, como leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda y leucemia megacarioblástica aguda, 5 leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, linfoma, cáncer de mama como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, linfoma de células B del centro germinal o leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia 10 linfocítica crónica (CLL), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de mama como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma 15 hepatocelular (HCC), carcinoma ovárico seroso de alto grado, cáncer peritoneal, Mieloma latente, glioma.

Composiciones terapéuticas de proteína de unión y
administración de estas

20 Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden proteínas de unión están dentro del alcance de la descripción. Tales composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de unión, o un 25 conjugado de proteína-fármaco de unión, en mezcla con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente

aceptable seleccionado para idoneidad con el modo de administración.

Los materiales de formulación aceptables preferentemente no son tóxicos para los receptores en las
5 dosis y concentraciones empleadas.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad,
10 estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), Antimicrobianos, antioxidantes (por ejemplo,
15 ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio), reguladores (por ejemplo, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, U otros ácidos orgánicos), agentes que abultan (como manitol o glicina), agentes quelantes (como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA)),
20 agentes complejantes (como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), rellenos, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos (como glucosa, manosa o dextrinas), proteínas (como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas), colorantes,
25 saborizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrófilos (como polivinilpirrolidona), polipéptidos de

bajo peso molecular, contraiones formadores de sal (como sodio), preservantes (como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, tierosal, fenetol, alcohol metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico
5 o peróxido de hidrógeno), disolventes (como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcar (como manitol o sorbitol), agentes suspensivos, tensioactivos o agentes humectantes (como plurónicos; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbato tales como polisorbato 20
10 o polisorbato 80; triton; trometamía; lecitina; colesterol o tyloxapol), agentes que mejoran la estabilidad (como sacarosa o sorbitol), agentes que mejoran la tonicidad (como haluros metálicos alcalinos - preferentemente cloruro de sodio o potasio - o manitol sorbitol), vehículos de
15 entrega, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (ver, p. ej., REMINGTON'S PHARMACROMATIC SCIENCES (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), y ediciones posteriores de la misma, incorporadas aquí por referencia para cualquier propósito).

20 La composición farmacéutica óptima se determinará por un experto en la técnica según, por ejemplo, la vía de administración prevista, formato de administración y dosis deseada. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la
25 velocidad de entrega in vivo y la velocidad de eliminación in vivo de la proteína de unión.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado para inyección puede ser agua, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina regulada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos ilustrativos adicionales. Además, la proteína de unión se puede formular como formulación líquida o como liofilizado usando excipientes apropiados.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden seleccionarse para administración intravenosa o subcutánea. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para suministrarse a través del tracto digestivo, tal como oralmente. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia de la técnica.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso pueden estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos que comprende la proteína de unión deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente

adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la cual una proteína de unión se formula como una solución isotónica estéril, conservada adecuadamente. Aun otra preparación puede incluir la formulación de la
5 molécula deseada con un agente, tal como perlas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas, o liposomas, que proporciona la entrega controlada o sostenida del producto que después
10 puede suministrarse a través de una inyección de depósito. El ácido hialurónico también puede usarse, y esto puede tener el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen
15 dispositivos de suministro de fármacos implantables.

En una modalidad, una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. Por ejemplo, una proteína de unión puede formularse como un polvo seco para inhalación. Las soluciones de inhalación de
20 proteínas de unión también pueden formularse con un propulsor para la administración de aerosol. En aún otra modalidad, las soluciones pueden nebulizarse.

También se contempla que ciertas formulaciones puedan administrarse oralmente. En una modalidad de la
25 descripción, las proteínas de unión que se administran de esta manera pueden formularse con o sin los portadores

usados habitualmente en el compuesto de formas de dosificación sólidas tales como tabletas y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede diseñarse para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tracto
5 gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad, y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la proteína de unión. También pueden emplearse diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión,
10 aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de tabletas y aglutinantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad efectiva de proteínas de unión en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la
15 fabricación de comprimidos. Al disolver las tabletas en agua estéril u otro vehículo adecuado, las soluciones pueden prepararse en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato
20 sódico o bicarbonato, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas adicionales de la
25 descripción serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio, incluidas las formulaciones que implican

proteínas de unión en formulaciones de entrega sostenida o controlada. Los expertos en la técnica conocen también las técnicas para formular una variedad de otros medios de entrega sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Los ejemplos adicionales de preparaciones de entrega sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Las matrices de entrega sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil -L-glutamato, poli (2-hidroxietil-metacrilato), etileno vinil acetato o ácido poli-D (-) -3-hidroxibutírico. Las composiciones de entrega sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas a usar para la administración in vivo deben ser típicamente estériles. Esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede llevarse a cabo ya sea antes, o después, de liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales

generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica.

5 Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar o en una
10 forma (p. ej., liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

La descripción también abarca kits para producir una unidad de administración de dosis única. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente
15 que tiene una proteína seca y un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta descripción kits que contienen jeringas precargadas únicas y de múltiples cámaras (p.
ej., jeringas de líquido y jeringas).

20 La cantidad efectiva de una composición farmacéutica de proteína de unión a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación adecuados para el
25 tratamiento variarán, por lo tanto, en parte, en la molécula suministrada, la indicación para la cual se usa la

proteína de unión, la ruta de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal, o tamaño de órganos) y condición (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

La frecuencia de dosis depende de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de unión en la formulación que se usen. Típicamente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, ya que dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) con el tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo o catéter de implantación. Los expertos en la técnica realizan rutinariamente un refinamiento adicional de la dosis adecuada y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por ellos. Pueden determinarse las dosis adecuadas mediante el uso de datos adecuados de dosis-respuesta.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, p. ej., oralmente; vía subcutánea; mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, vías intraoculares,

intraarteriales, intraportales o intralesionales; mediante sistemas de entrega continua; o por dispositivos de implantación. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse mediante inyección de bolo o de manera
5 continua mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

La composición puede administrarse, además, localmente mediante la implantación de una membrana, esponja u otro material adecuado sobre el cual la molécula
10 deseada se haya absorbido o encapsulado. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de entrega temporizada o administración
15 continua.

Régimen terapéutico

La descripción también proporciona un método para tratar el mieloma múltiple en un sujeto que lo
20 necesita. El método emplea un anticuerpo heterodimérico que acopla CD3, BCMA y CD38 de tal manera que conecta transitoriamente células malignas con células T que se acoplan, induciendo así la muerte mediada por células T de la célula maligna unida. El método descrito en la
25 presente descripción usa un anticuerpo heterodimérico que se une a CD3, BCMA y CD38 de tal manera que maximiza la

destrucción de las células diana mientras reduce los efectos secundarios no deseados (p. ej., entrega no controlada de citocinas).

Los términos “tratamiento” o “tratar”, como se usan en la presente descripción, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. El anticuerpo de la presente invención se administra a un sujeto que lo necesita; Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que tienen un trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. El anticuerpo de la presente invención se puede usar para tratar a seres humanos con cáncer, o a seres humanos susceptibles al cáncer, o mejorar el cáncer en un sujeto humano, así como para prevenir el cáncer en un paciente humano. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este de la presente invención se administra a un sujeto que lo necesita, p. ej., un sujeto humano que padece un cáncer que expresa BCMA y/o un cáncer que expresa CD38, tal como mieloma múltiple, tal como mieloma múltiple recidivante/refractario. El mieloma recidivante se caracteriza como una recurrencia de la enfermedad después de la respuesta previa. Los ejemplos de criterios de laboratorio y radiológicos que señalizan la enfermedad incluyen, entre otros, > 25 % de aumento de la proteína monoclonal de suero u orina (proteína M) o > 25 % de

diferencia entre las cadenas ligeras libres de suero involucradas y no implicadas de nadir, respectivamente, o el desarrollo de nuevos plasmacitomas o hipercalcemia. Sonneveld et al., Haematologica. abril de 2016; 101(4):
5 396-406.

En pacientes no secretores, la recaída se caracteriza por un aumento de las células plasmáticas de médula ósea. Una señal para la enfermedad recidivante también se caracteriza por la aparición o resurgimiento
10 de uno o más criterios de CRAB o una recaída bioquímica rápida y consistente. El mieloma refractario es el mieloma que no responde al tratamiento. El mieloma múltiple recidivante/refractario se refiere a la enfermedad la cual se vuelve no sensible o progresiva en
15 la terapia o dentro de los 60 días del último tratamiento en pacientes que previamente lograron al menos una respuesta mínima en la terapia previa. Sonneveld, supra; Anderson et al., Leukemia. 2008;22(2):231-239.

El método de la descripción comprende administrar
20 al sujeto una dosis de entre aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, por ejemplo entre aproximadamente 0,0005 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,0015 mg/kg a
25 aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre

aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,06 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,09 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,12 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,18 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,36 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 1,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o entre aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg. Por ejemplo, entre aproximadamente 0,0001 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, o entre aproximadamente 0,0005 mg/kg y aproximadamente

10 mg/kg, o entre aproximadamente 0,0005 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, o entre aproximadamente 0,0005 mg/kg y aproximadamente 1,5 mg/kg, o entre aproximadamente 0,0005 mg/kg y aproximadamente 1,2 mg/kg.

5 La presente descripción también incluye rangos de dosificación de cualquier valor incluido entre los intervalos descritos anteriormente. Por ejemplo, el anticuerpo triespecífico de la presente invención se administra a un paciente en una dosis única o múltiples,

10 seleccionadas del grupo que comprende al menos aproximadamente 0,0001 mg/kg, al menos aproximadamente 0,0005 mg/kg, al menos aproximadamente 0,001 mg/kg, al menos aproximadamente 0,0015 mg/kg, al menos aproximadamente 0,005 mg/kg, al menos aproximadamente

15 0,01 mg/kg, al menos aproximadamente 0,015 mg/kg, al menos aproximadamente 0,03 mg/kg, al menos aproximadamente 0,05 mg/kg, al menos aproximadamente 0,06 mg/kg, al menos aproximadamente 0,09 mg/kg, al menos aproximadamente 0,1 mg/kg, al menos aproximadamente 0,12 mg/kg, al menos

20 aproximadamente 0,15 mg/kg, al menos aproximadamente 0,18 mg/kg, al menos aproximadamente 0,2 mg/kg, al menos aproximadamente 0,3 mg/kg, al menos aproximadamente 0,36 mg/kg, al menos aproximadamente 0,5 mg/kg, al menos aproximadamente 0,6 mg/kg, al menos aproximadamente

25 0,7 mg/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, al menos aproximadamente 1,2 mg/kg, al menos aproximadamente

1,5 mg/kg, al menos aproximadamente 2 mg/kg, al menos
aproximadamente 3 mg/kg, al menos aproximadamente 4 mg/kg,
al menos aproximadamente 5 mg/kg, al menos aproximadamente
7 mg/kg, al menos aproximadamente 10 mg/kg, al menos
5 aproximadamente 12 mg/kg, al menos aproximadamente
16 mg/kg, al menos aproximadamente 50 mg/kg, al menos
aproximadamente 100 mg/kg, al menos aproximadamente
150 mg/kg, al menos aproximadamente 200 mg/kg.

En diversos aspectos del método, la dosis se
10 ajusta durante el transcurso del tratamiento. Por
ejemplo, al sujeto se le administra una dosis inicial en
una o más administraciones, y se utiliza una dosis más
alta en una o más administraciones posteriores. Dicho de
otra manera, la descripción contempla el aumento de la
15 dosis de anticuerpo triespecífico al menos una vez
durante el curso del tratamiento. Alternativamente, la
dosis puede reducirse durante el curso del tratamiento,
de modo que la cantidad de anticuerpo heterodimérico se
reduce a medida que avanza el tratamiento.

20 La descripción contempla un método en donde se
administran múltiples (es decir, dos o más) dosis del
anticuerpo triespecífico durante el curso de un período de
tratamiento. Las dosis individuales pueden administrarse en
cualquier intervalo, tal como una vez a la semana, dos
25 veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a
la semana o cinco veces a la semana. Las dosis individuales

pueden administrarse cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En otras palabras, en algunos aspectos, transcurre un período de espera de dos semanas entre la administración de anticuerpos heterodiméricos al sujeto. El período de espera entre las administraciones de las dosis no necesita ser consistente durante el curso del período de tratamiento. En otras palabras, el intervalo entre dosis puede ajustarse durante el transcurso del tratamiento. En algunos aspectos, el método comprende administrar dos dosis de anticuerpo heterodimérico por semana al sujeto en la primera y segunda semanas de tratamiento (es decir, dos veces a la semana durante las semanas 1 y 2), administrar una dosis de anticuerpo heterodimérico por semana al sujeto en la tercera y cuarta semanas de tratamiento (es decir, una vez a la semana durante las semanas 3 y 4), y administrar una dosis de anticuerpo heterodimérico cada dos semanas a partir de la semana 5 a través del final del tratamiento (es decir, hay un período de espera de dos semanas entre dosis que comienzan en la semana 5 a través del final del tratamiento).

Alternativamente, en diversos aspectos, el método comprende administrar una dosis de anticuerpo triespecífico por semana durante 1-4 semanas de tratamiento, y opcionalmente administrar una dosis del

anticuerpo cada dos semanas a partir de la semana 5 a través del final del tratamiento.

Las dosis múltiples de anticuerpo heterodimérico se administran durante un período de
5 tratamiento de, p. ej., tres meses a aproximadamente 18 meses, o aproximadamente tres meses a aproximadamente 12 meses, o aproximadamente tres meses a aproximadamente nueve meses, o aproximadamente tres meses a aproximadamente seis meses, o aproximadamente tres meses
10 a aproximadamente ocho meses, o aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses, o aproximadamente seis meses a aproximadamente 12 meses, o aproximadamente ocho meses a aproximadamente 12 meses, o aproximadamente seis meses a aproximadamente ocho meses, o aproximadamente
15 ocho meses a aproximadamente 12 meses (p. ej., aproximadamente ocho meses). Opcionalmente, las dosis múltiples (es decir, dos o más) del anticuerpo heterodimérico se administran durante un período de tratamiento de aproximadamente 12 semanas a
20 aproximadamente 52 semanas, o de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 36 semanas, o de aproximadamente 24 semanas a aproximadamente 32 semanas, con dosis administradas dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas o una vez cada cuatro
25 semanas.

Por “tratar” mieloma múltiple se entiende el logro de cualquier respuesta terapéutica positiva con respecto a la enfermedad. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva incluye una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en la cantidad de células neoplásicas; (2) un aumento en la muerte de células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de las células neoplásicas; (4) reducción de la producción de paraproteínas por las células tumorales; (5) inhibición (es decir, ralentización en cierta medida, preferentemente, detención) del crecimiento tumoral; (6) un aumento de la tasa de supervivencia del paciente; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección. La respuesta tumoral puede evaluarse para determinar cambios en la morfología tumoral (es decir, carga tumoral general, tamaño del tumor y lo similar) usando técnicas de detección tales como escaneo de imágenes por resonancia magnética (MRI), imagenología por rayos x, tomografía tomográfica computarizada (CT), imágenes de escaneo óseo, endoscopía y muestreo de biopsia tumoral que incluyen aspiración de médula ósea (BMA) y recuento de células tumorales en la circulación. No se requiere una respuesta terapéutica completa (es decir, ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal,

médula ósea y líquido cefalorraquídeo (LCR) o proteína monoclonal anormal); se contempla cualquier grado de mejora.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este
5 se puede administrar al sujeto por cualquier medio adecuado, p. ej., por vía intravenosa, subcutánea, intraarterial, intralinfática, intratecal, intracerebral, intraperitoneal, intracerebroespinal, intradérmica, intraarticular, intrasinovial, oral, tópica o por
10 inhalación, bomba osmótica, encapsulación de fármacos, como encapsulación de nanopartículas, administración de fármacos mediada por recubrimiento de superficie. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse mediante administración intravenosa como un bolo o mediante
15 infusión continua durante un período de tiempo. En modalidades particulares, el anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa, p. ej., durante un período de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente cuatro horas. Opcionalmente, el tiempo para infusión se reduce
20 en administraciones posteriores. Por ejemplo, en una modalidad, la primera dosis de anticuerpo se administra durante un período de aproximadamente cuatro horas, y las dosis posteriores se administran durante un período de dos horas o menos. En este sentido, la primera dosis de
25 anticuerpo se administra opcionalmente durante un período de aproximadamente cuatro horas, la segunda dosis de

anticuerpo se administra opcionalmente durante un período de aproximadamente dos horas, y las dosis posteriores se administran opcionalmente durante un período de aproximadamente 30 minutos. En otra modalidad particular, 5 el anticuerpo triespecífico de la presente invención se administra por vía subcutánea.

En algunos casos, el sujeto ha sido tratado previamente para un cáncer, tal como mieloma múltiple. Por ejemplo, se le puede haber administrado al sujeto 10 previamente un fármaco inmunomodulador (talidomida, lenalidomida, pomalidomida), un inhibidor de proteasoma (tal como pomalidomida, bortezomib o carfilzomib), dexametasona, doxorubicina o combinaciones de estos.

Opcionalmente, el sujeto se trató previamente 15 con un anticuerpo monoespecífico anti-CD38, tal como daratumumab (DARZALEX®). En diversas modalidades, el sujeto es recidivante o refractario con un tratamiento previo con anticuerpos monoespecíficos anti-CD38. El método puede comprender un período de espera entre la 20 administración previa de anticuerpo monoespecífico anti-CD38 y la administración del anticuerpo heterodimérico.

Coterapia

Opcionalmente, el anticuerpo o fragmento de 25 anticuerpo de este de la presente invención es parte de un régimen terapéutico que comprende la administración de

uno o más agentes terapéuticos, radioterapia, trasplante de células madre y lo similar.

El método de la descripción comprende además administrar dexametasona al sujeto.

5 La dexametasona puede administrarse por cualquier vía, tal como las rutas descritas aquí. Preferentemente, la dexametasona se administra por vía intravenosa u oral. Cuando la dexametasona se administra por vía intravenosa, se administra al sujeto una hora antes de la administración
10 del anticuerpo. La dexametasona se administra opcionalmente en una cantidad de aproximadamente 8 mg o aproximadamente 4 mg.

En diversas modalidades, el método de la descripción comprende además administrar un agente
15 quimioterapéutico. Los ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de la topoisomerasa I (p. ej., irinotecán, topotecán, camptotecina y análogos o metabolitos de estos, y doxorubicina); inhibidores de la topoisomerasa II (p. ej.,
20 etopósido, tenipósido y daunorrubicina); agentes alquilantes (p. ej., melfalano, clorambucil, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbacina, metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida); intercaladores de ADN (p. ej., cisplatino,
25 oxaliplatino y carboplatino); Intercaladores de ADN y generadores de radicales libres como la bleomicina; y

miméticos de nucleósidos (p. ej., 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxiurea).

Los agentes quimioterapéuticos que interrumpen la replicación celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida y análogos relacionados (p. ej., CC-5013 y CC-4047); inhibidores de proteína tirosina quinasa (p. ej., mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores del proteasoma (p. ej., bortezomib, CEP-18770, MG132, vinil sulfonas peptídicas, epoxicetonas peptídicas (tales como epoximicina y carfilzomib), inhibidores de beta-lactona (tales como lactacistina, MLN 519, NPI-0052, salinosporamida A), compuestos que crean complejos de ditiocarbamato con metales (tales como disulfiram) y ciertos antioxidantes (tales como epigallocatequina-3-galato, catequina -3-galato y salinosporamida A); inhibidores de NF- κ B, que incluyen inhibidores de la quinasa I κ B; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y, por lo tanto, regulan negativamente la replicación celular (p. ej., trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o enzimas que se sabe que se regulan positivamente, sobreexpresados o activados en cánceres, cuya inhibición regula negativamente la replicación celular.

El régimen terapéutico puede comprender la administración de otras terapias de anticuerpos, tales como elotuzumab (un monoclonal humanizado contra SLAMF7; Tai et al., Blood, 2008;112:1329-37); daratumumab, MOR202, y isatuximab que se dirige a CD38; nBT062-SMCC-DMI, nBT062-SPDB-DM4, y nBT062-SPP-DMI que se dirige a CD138; lucatumumab (también conocido como HCD122) y dacetuzumab (también conocido como SGN-40) que se dirige a CD40; lorvotuzumab que se dirige a CD56. Para una revisión de los agentes terapéuticos de anticuerpos para el tratamiento de mieloma múltiple, ver, p. ej., Tandon et al., Oncology & Hematology Review, 2015;11(2):115-21, and Sondergeld et al., Clinical Advances in Hematology & Oncology, 2015; 13(9), 599, ambos incorporados como referencia.

En algunas modalidades, el anticuerpo heterodimérico se administra antes, simultáneamente o después del tratamiento con inhibidores del proteasoma (bortezomib, carfilzomib e ixazomib), fármacos inmunomoduladores (IMiD) como los derivados de la talidomida pomalidomida y lenalidomida, el inhibidor de la histona desacetilasa Panobinostat, anticuerpos como Daratumumab, Teclistamab, Isatuximab, Elotuzumab Talquetamab, Alnuctamab, Belantamab, Elranatamab o cualquier otro compuesto y/o fármaco y/o bioterapéutico citado anteriormente, incluyendo también venetoclax,

mafodotin seliniexor, dexametasona, doxorubicina, melflufen, terapia de células CAR-T y sus combinaciones.

Todas las referencias citadas se incorporan expresamente en la presente como referencia en su totalidad. Si bien las modalidades particulares de la invención se han descrito anteriormente con fines ilustrativos, los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

FIGURAS

Figura 1. El candidato anti-CD3 humano C1 se une a CD3 humano e induce la activación de las células T. La unión de candidatos anti-CD3 a PBMC humanos se evaluó mediante citometría de flujo (A). Al mismo tiempo, se evaluó mediante citometría de flujo la capacidad de los candidatos anti-CD3 para inducir la activación de células T humanas purificadas durante 48 h, a través de la regulación positiva de CD69 en las células T CD4⁺ (B). Cada punto es la media +/- desviación estándar de tres mediciones independientes de un experimento representativo. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 1.

Figura 2. El candidato anti-CD3-C1 y los candidatos anti-CD3-C1 optimizados se unen específicamente a CD3 humano. Se evaluó la unión de candidatos anti-CD3 a líneas celulares HPB-ALL silvestre y knock-out para CD3 mediante citometría de flujo. Cada barra representa la media geométrica de fluorescencia de una réplica probada a 8 nM de un experimento representativo. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 2.

Figura 3. Formato de las moléculas herramienta usadas para la evaluación de la propensión a la activación de las células T por parte de los aglutinantes CD3.

Figura 4. El candidato 2+1 C1-D6/BCMA desencadena la muerte más potente de células tumorales y la activación de células T en un ensayo de lisis redirigida. La capacidad de candidatos 2+1 CD3xBCMA-dAbx2 para desencadenar la muerte mediada por células T de células tumorales NCI-H929 (A) se evaluó en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 y se midió por citometría de flujo después de 48 horas de incubación. En el mismo ensayo, se evaluó la activación de las células T humanas mediante citometría de flujo, medida por el porcentaje de regulación positiva de CD69 en las células T CD4 (B). Cada punto es la media +/- desviación estándar de dos réplicas técnicas de un

donante representativo. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 3.

Figura 5. Mapeo del epítipo HDX del aglutinante C1-D6 en hCD3ye. hCD3ye mostró una reducción significativa en la captación de deuterio (-10) al unirse a la IgG en AA182-197, YVCYPRGSKPEDANFY (sec. con núm. de ident.: 726), lo que indica que este era el epítipo principal. La Figura 5 muestra el mapa de calor diferencial que compara el intercambio de hidrógeno/deuterio de hsCD3 y (23-103)-hsCD3 e (23-118) solo con el de hsCD3 y (23-103)-hsCD3 e (23-118) y IgG1 LALA anti-CD3-C1-D6.

Figura 6. Bloqueo de la interacción BCMA humano/APRIL humano y bloqueo de la interacción BCMA humano/BAFF humana tras la unión de Fab de anti-BCMA-D3 y Fab de anti-BCMA-E6 a BCMA humano evaluado mediante resonancia de plasmón superficial. La proteína APRIL-his humana recombinante o la proteína BAFF-his humana recombinante se cargó en un sensor CM5 CHIP previamente recubierto con anticuerpo antihistidina. Se inyectó una solución de 50 nM de proteína BCMA-Fc recombinante premezclada con concentraciones variables (0 nM, 25 nM, 50 nM o 200 nM) de Fab de anti-BCMA-D3 en regulador de ejecución sobre A) APRIL humano inmovilizado o B) BAFF humano inmovilizado. De manera similar, se inyectó una solución de 50 nM de proteína BCMA-Fc recombinante

premezclada con concentraciones variables (0 nM, 25 nM, 50 nM o 200 nM) de Fab de anti-BCMA-E6 en regulador de ejecución sobre C) APRIL humano inmovilizado o D) BAFF humano inmovilizado. El gráfico muestra los datos expresados como número de unidades de resonancia (abreviado como RU; eje Y) vs. tiempo (eje X).

Figura 7. Los candidatos madurados por afinidad anti-BCMA-D3 y anti-BCMA-E6 se unen específicamente a BCMA. Se evaluó la unión de los candidatos anti-BCMA a las líneas celulares BCMA silvestre y noqueadas de NCI-H929 mediante citometría de flujo. Cada barra representa la media geométrica de fluorescencia de una réplica probada a 10 nM de un experimento representativo. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 6.

Figura 8. Agrupamiento de epítomos de Fab de anti-CD38-E2, Fab de anti-CD38-B3 y Fab daratumumab a CD38 humano mediante interferometría de biocapa de octetos. La proteína humana biotinilada CD38-avi-his se cargó en un biosensor de estreptavidina SA. El anticuerpo 1 de Fab (Abl) se inyectó en CD38 humano inmovilizado a 200 nM en regulador cinético para alcanzar la saturación de la superficie. Después, se inyectó una solución premezclada de anticuerpo 2 de Abl y Fab (Ab2) a una concentración final de 200 nM en superficie saturada (fase de competencia). Se realizó el mismo procedimiento experimental usando Abl a 400 nM solo en la fase de

competencia como control para la saturación de la superficie. La gráfica muestra la unión a la punta del sensor como un cambio de longitud de onda (respuesta, en nm; Eje Y) vs. tiempo (eje X) para A) Fab de anti-CD38-E2 como Abl B) Fab de anti-CD38-B3 como Abl y C) Fab daratumumab como Abl. Las curvas se etiquetan mediante nombre de clon Ab2.

Figura 9. Diagrama esquemático de anticuerpos triespecífico de CD3/BCMA/CD38. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se construyeron con tres Fab dirigidos a tres antígenos separados, mediante lo cual el dominio Fab “Fc distal” se fusionó al extremo N del dominio VH del Fab “Fc proximal”. A). La configuración BO (BTB externo) CD3/BCMA/CD38 tenía el aglutinante CD38 en el brazo A, el brazo de unión CD3 en la posición distal Fc externa del brazo B y el BCMA en la posición “proximal Fc” del brazo B, mientras que para B) la configuración C el CD3/BCMA/CD38 tenía el brazo de unión CD3 en el brazo A, el aglutinante BCMA en la posición distal Fc del brazo B y el aglutinante CD38 en la posición proximal Fc del brazo B.

Figura 10. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para anticuerpos CD3/BCMA/CD38 incluyendo análisis de transición térmica. Análisis de termograma y transición térmica de A. TREAT CD3/BCMA/CD38-115; B. TREAT

CD3/BCMA/CD38-117; C. TREAT CD3/BCMA/CD38-118 y D. TREAT CD3/BCMA/CD38-119. Los despliegues de los dominios correspondientes a las diferentes transiciones fueron asignados entre paréntesis después de las temperaturas correspondientes.

Figura 11. Mediciones de resonancia de plasmón superficial de anticuerpos CD3/BCMA/CD38 contra hCD3εδ. El hCD3εδ biotinilado (CD3E y CD3D-377H, Creative Biomart, EE. UU.) se inmovilizó en la superficie del sensor a través del reactivo Biotin CAPture, una estreptavidina modificada que se puede unir de forma reversible a la superficie del chip CAP. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se inyectaron en series de concentraciones (como se describe en la figura) en regulador HBS-EP+ sobre hCD3εδ inmovilizado. Los gráficos muestran datos expresados como número de unidades de resonancia (abreviado como RU; Eje Y) vs. tiempo (s, eje X) para A. TREAT CD3/BCM A/CD38-115; B. TREAT CD3/BCMA/CD38-117; C. TREAT CD3/BCM A/CD38-118 y D. TREAT CD3/BCM A/CD38-119. La afinidad de unión a CD3εδ humano se midió usando un modelo de afinidad de estado estable. Este modelo usa la gráfica de la respuesta de equilibrio (Req; Eje Y) vs. concentración de analito (M; Eje X) para el cálculo de afinidad de acuerdo con la siguiente ecuación: $Req = K_A \times C \times R_{\text{máx}} / (K_A \times C \times n + 1)$, la concentración al 50 % de saturación es la constante de disociación de equilibrio (K_D).

Figura 12. Mediciones de resonancia de plasmón superficial de anticuerpos CD3/BCMA/CD38 contra CD38 humano. La hCD38 biotinilada (proteína CD38 humana biotinilada, Avitag™, His Tag, CD8-H82E7, Acrobiosystems, EE. UU.) se inmovilizó en la superficie del sensor a través del reactivo Biotin CAPture, una estreptavidina modificada que se puede unir de forma reversible a la superficie del chip CAP. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se inyectaron en series de concentraciones (como se describe en la figura) en regulador HBS-EP+ sobre hCD38 inmovilizado. Los gráficos muestran datos expresados como número de unidades de resonancia (abreviado como RU; Eje Y) vs. tiempo (s, eje X) para A. TREAT CD3/BCMA/CD38-115; B. TREAT CD3/BCMA/CD38-117; C. TREAT CD3/BCMA/CD38-118 y D. TREAT CD3/BCMA/CD38-119. Las afinidades de unión a CD38 humano se midieron usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Este modelo supone una interacción 1:1 entre el ligando y el analito y determina la constante de tasa de asociación (k_a), constante de velocidad de disociación (k_d) y afinidad (K_D) para cada muestra. Usando este modelo, la K_D se define como la relación entre la constante de velocidad de disociación incluida y la constante de velocidad de asociación, es decir, $K_D = k_d / k_a$. Las mediciones muestras de concentración cero para referencia. Se usaron χ^2 y valores residuales para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales (sensorgrama fc2-fc1)

y los modelos de unión individuales. Las líneas sólidas representan los datos medidos, mientras que las líneas punteadas representan ajustes simulados. K_D : constante de disociación de equilibrio; k_a : constante de tasa de asociación. k_d : constante de velocidad de disociación.

Figura 13. Mediciones de resonancia de plasmón superficial de anticuerpos CD3/BCMA/CD38 contra BCMA humano. La hBCMA biotinilada (proteína BCMA humana biotinilada/TNFRSF17, His, archivo DMF Avitag™, BCA-H82E4, Acrobiosystems, EE. UU.) se inmovilizó en la superficie del sensor a través del reactivo Biotin CAPture, una estreptavidina modificada que se puede unir de forma reversible a la superficie del chip CAP. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se inyectaron en series de concentraciones (como se describe en la figura) en regulador HBS-EP+ sobre hBCMA inmovilizado. Los gráficos muestran datos expresados como número de unidades de resonancia (abreviado como RU; Eje Y) vs. tiempo (s, eje X) para A. TREAT CD3/BCMA/CD38-115; B. TREAT CD3/BCMA/CD38-117; C. TREAT CD3/BCMA/CD38-118 y D. TREAT CD3/BCMA/CD38-119. Las afinidades de unión a CD38 humano se midieron usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Este modelo supone una interacción 1:1 entre el ligando y el analito y determina la constante de tasa de asociación (k_a), constante de velocidad de disociación (k_d) y afinidad (K_D) para cada muestra. Usando este modelo, la K_D se define como la relación entre la tasa de disociación

y la tasa de asociación, es decir, $K_D = k_d / k_a$. Las mediciones incluyeron muestras de concentración cero para referencia. Se usaron tanto Chi2 como valores residuales para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales (sensorgrama fc2-fc1) y los modelos de unión individuales. Las líneas sólidas representan los datos medidos, mientras que las líneas punteadas representan ajustes simulados. K_D : constante de disociación de equilibrio; k_a : constante de tasa de asociación; k_d : constante de velocidad de disociación.

Figura 14. Unión por resonancia de plasmón superficial de TREAT CD3/BCMA/CD38 seleccionados a los receptores Fc en comparación con trastuzumab IgG1. (A) CD3/BCMA/CD38-115, (B) CD3/BCMA/CD38-117, (C) CD3/BCMA/CD38-118, (D) CD3/BCMA/CD38-119 y € trastuzumab IgG1.

Figura 15. Perfil de AC-SINS de TREATS CD3/BCMA/CD38 seleccionados.

Figura 16. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 se unen a las células T humanas primarias CD38-negativas. La unión de los candidatos anti-CD3 a las células T humanas CD38 negativas se evaluó mediante citometría de flujo, y las curvas de unión se representan en la Figura 16A. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de seis mediciones de donantes de células T independientes de dos experimentos individuales. Los valores de K_D se

determinaron a partir de las curvas de unión se graficaron y se compararon con los puntos de referencia en la Figura 16B usando un ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. # significa significativamente diferente a 83A10-TCBcv. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 17. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 se unen a líneas celulares que muestran expresión variable de CD38 y BCMA. Se evaluó la unión de los candidatos CD3/BCMA/CD38, -118, -119 y el punto de referencia 83A10-TCBcv a CD38 y BCMA mediante citometría de flujo en diferentes líneas celulares que mostraban expresión variable de CD38 y BCMA, KMS-12-BM (A), MOLP-8 (B) y NCI-H929 (C). Cada punto es la media +/- desviación estándar de tres mediciones de tres experimentos individuales. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 18. El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de líneas celulares de mieloma múltiple que muestran expresión variable de CD38 y BCMA. La capacidad de los candidatos y puntos de referencia CD3/BCMA/CD38 para desencadenar la muerte mediada por células T de las células tumorales KMS-12-BM (A), MOLP-8 (B) y NCI-H929 (C) se evaluó en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 y

se midió por citometría de flujo después de 72 horas de incubación. Los valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte (EC_{50}) se determinaron a partir del ensayo de lisis redirigida. Cada punto representa el valor de EC_{50} para un donante individual. Las medias se compararon usando un ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. * significa estadísticamente significativo en comparación con TNB-F2B BEAT Fc. # significa estadísticamente significativo en comparación con 83A10-TCBcv. + significa estadísticamente significativo en comparación con BEAT CD3/CD38. Se realizaron tres experimentos independientes para cada candidato con un total de 6 donantes. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 19. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 inducen una fuerte activación y proliferación de células T asociadas con la muerte de KMS-12-BM. Se evaluó la capacidad de los candidatos y puntos de referencia CD3/BCMA/CD38 para desencadenar la muerte mediada por células T de células KMS-12-BM y, en consecuencia, la activación y proliferación de células T, en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1. Al final del estudio se evaluó la proliferación y la expresión de CD25 de células T $CD4^+$ y $CD8^+$. La figura muestra valores de EC_{50} de activación o proliferación. Cada punto representa el valor de EC_{50} para un donante

individual. Se realizaron tres experimentos independientes para cada candidato con un total de 6 donantes. Las medias se compararon usando un ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. * significa estadísticamente significativo en comparación con TNB-F2B BEAT Fc. # significa estadísticamente significativo en comparación con 83A10-TCBcv + significa estadísticamente significativo en comparación con BEAT CD3/CD38. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 20. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 inducen una liberación mínima de citocinas asociada con la actividad fuera del tumor en la diana en comparación con los controles positivos y el punto de referencia 83A10-TCBcv. La liberación de citocinas se evaluó en un ensayo de alta densidad. Al final, los sobrenadantes se almacenaron a -80°C y se evaluó la liberación de citocinas para IFN-gamma (A), TNF-alfa (B), IL-2 (C), IL-6 (D) e IL-10 μ M usando el ensayo Meso Scale Discovery (MSD). Cada barra es la media +/- desviación estándar. Se analizaron un total de cuatro donantes de PBMC en dos experimentos independientes. Las líneas de puntos muestran un control positivo (PHA) y un control negativo. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 21. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 no se unen a los glóbulos rojos en comparación con daratumumab y magrolimab. La unión de los candidatos CD3/BCMA/CD38 y los puntos de referencia a los glóbulos rojos se evaluó mediante citometría de flujo (A). Cada punto representa el área bajo la curva (AUC) de una curva de respuesta a la dosis para cada donante. Las medias se compararon usando un ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Dunnett con daratumumab (* $P < 0,05$) (B). La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 22. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 no inducen hemaglutinación. Se evaluó la propensión de los candidatos CD3/BCMA/CD38 y de los puntos de referencia a inducir hemaglutinación en un ensayo de Coombs. Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar de Coombs para seis donantes. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 23. CD3/BCMA/CD38_118 muestra una muerte superior de NCI-H929 en la muerte de múltiples modos de acción en comparación con los puntos de referencia anti-CD38. Se evaluó la capacidad de los candidatos y puntos de referencia CD3/BCMA/CD38 para desencadenar la lisis de células NCI-H929 en un ensayo de muerte de múltiples modos de acción (MmoAK) en presencia de suero humano e IL-2. Cada punto representa la media $\pm$ media de error

estándar del porcentaje de muerte de la diana (A), EC_{50} de muerte (B) y el área bajo la curva (AUC) de una curva de respuesta a la dosis para cada donante (C). Las medias (5-8 donantes) se compararon usando Kruskal-Wallis seguido de la comparación post-hoc de Dunn o una prueba ANOVA unidireccional pareada seguida de la comparación post-hoc de Tukey (* $P < 0,05$, ** $0,01 < P < 0,05$, *** $P < 0,01$). La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 18.

Figura 24. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 controlan los tumores NCI-H929 de manera dependiente de la dosis, con mayor potencia que el referencia 83A10-TCBcv en dosis más bajas. Los ratones hembra NCG fueron injertados el día -10 sc con 1×10^7 células tumorales MM NCI-H929 (CD38++ y BCMA++) e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante A: $n = 9$ ratones/grupo y Donante B: $n = 9$ ratones/grupo). Los ratones fueron aleatorizados el día 0 cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 150 mm^3 y tratamientos inyectados por vía intravenosa una vez por semana durante 3 semanas en los días 0, 7 y 14. A. Crecimiento del tumor NCI-H929 después del tratamiento con una dosis de 0,5 mg/kg (izquierda); Dosis de 0,1 mg/kg (centro) o dosis de 0,02 mg/kg (derecha) en ratones NCG inoculados con PBMC del donante A (arriba) o del donante B (abajo) ($n = 9$ ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra con la última observación realizada (LOCF). B.

Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de las moléculas indicadas en las dosis indicadas el día 13 o 14 después del tratamiento (después de dos inyecciones intravenosas) en ratones NCG inoculados con PBMC del donante A (izquierda) o del donante B (derecha) (n = 3 ratones/grupo). La concentración de moléculas se determinó usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano (un método para cuantificar IgG humana anti-BCMA). Se muestran la media $\pm$ DE, donde los valores dentro de las barras representan las concentraciones medias y los valores superiores representan las diferencias.

Figura 25. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 retrasan sustancialmente el crecimiento de los tumores NCI-H929 a una dosis de 0,1 mg/kg, en comparación con el vehículo o el control ficticio CD3. Los ratones hembra NCG fueron injertados el día -11 sc con $\times 10^7$ células tumorales MM NCI-H929 (CD38++ y BCMA++) e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante A: n = 9 ratones/grupo y Donante B: n = 9 ratones/grupo). Los ratones fueron aleatorizados el día 0 cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 180 mm^3 y tratamientos inyectados por vía intravenosa una vez por semana durante 3 semanas en los días 0, 7 y 14. A. Crecimiento del tumor NCI-H929 después del tratamiento con una dosis de 0,1 mg/kg en ratones NCG inoculados con PBMC del donante A (arriba) o del donante B (abajo) (n = 9 ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra

con la última observación realizada (LOCF). B. Concentraciones plasmáticas de 87escrituras (ng/ml) de las moléculas indicadas el día 10 (para el vehículo y CD3/BCMA/CD38-122) o el día 14 (para los grupos restantes) después del tratamiento (después de dos inyecciones intravenosas) en ratones NCG inoculados con PBMC del donante A (arriba) o del donante B (abajo) (n = 3 ratones/grupo). La concentración de moléculas se determinó usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano (un método para cuantificar IgG humana anti-BCMA). Se muestran la media $\pm$ SD.

Figura 26. La eficacia de CD3/BCMA/CD38-118, -119 y 83A10-TCBcv en el control del tumor NCI-H929 se correlacionó con el grado de infiltración de células T dentro del microambiente tumoral. Los ratones hembra NCG injertados con células tumorales MM NCI-H929 e inoculados ip con PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante A y Donante B) fueron tratados con una dosis única iv de moléculas a 0,1 mg/kg el día 0, cuando el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente 180 mm³. Después de 2 o 6 días, se recolectaron los tumores y los bazo de los ratones tratados y se analizaron ex vivo mediante citometría de flujo (n = 2-3 ratones/grupo/punto temporal). A. Los gráficos de histograma muestran la expresión de TCR $\alpha\beta$ humano en células CD45+ humanas seleccionadas el día 2 (izquierda) y 6 (derecha) después

de una dosis única en el tumor. Los números indican el % de células positivas. Leyenda de arriba a abajo: Vehículo, 83A10-TCBcv, CD3/BCMA/CD38-118, CD3/BCMA/CD38-119, CD3/BCMA/CD38-122. B. El gráfico muestra el número de células TCR $\alpha\beta$ humanas por gramo de tumor en el día indicado y el donante de PBMC. Se muestran la media $\pm$ SD. C. Los gráficos de contorno muestran la expresión de CD69 humano vs. CD25 humano en células T CD8+ infiltradas en tumores el día 2 después de la dosificación con las moléculas indicadas. Los números dentro de los gráficos indican porcentajes. D. Los gráficos muestran el % de células T CD8 positivas para CD69 (izquierda) y CD25 (derecha) humanas en el tumor (arriba) y en el bazo (abajo) el día 2 después de la dosis única. Se muestran la media $\pm$ SD.

Figura 27. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 inducen la secreción de citocinas inflamatorias humanas en el microambiente tumoral. Los ratones hembra NCG injertados con células tumorales MM NCI-H929 e inoculados ip con PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante A y Donante B) fueron tratados con una dosis única iv de moléculas a 0,1 mg/kg el día 0, cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 180 mm³. Después de 2 o 6 días, se recolectaron los tumores de los ratones tratados y se recuperó el sobrenadante del tumor. El análisis de detección de citocinas se realizó en el sobrenadante del tumor usando

Luminex con un kit humano Cytokine & Chemokine 34-Plex (n = 2-3 ratones/grupo/punto temporal). Los gráficos muestran la concentración de la citocina indicada en el sobrenadante del tumor normalizada por gramo de tumor el día 2 o 6 después de la dosificación con las moléculas indicadas. Se muestran la media $\pm$ SD.

Figura 28. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 son al menos igualmente potentes que 83A10-TCBcv en el control de tumores BCMA^{low} CD38^{low} KMS-12-BM. A los ratones hembra NSG se les injertó el día 0 sc con 1×10^7 células tumorales MM KMS-12-BM (CD38^{low} y BCMA^{low}) e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante C: n = 8 ratones/grupo y Donante D: n = 8 ratones/grupo). Los ratones fueron aleatorizados el día 8 cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 150 mm³ y tratamientos inyectados por vía intravenosa una vez por semana durante 3 semanas los días 9, 16 y 23. A. Crecimiento del tumor KMS-12-BM después del tratamiento con una dosis de 0,5 mg/kg (izquierda); Dosis de 0,1 mg/kg (centro) o dosis de 0,02 mg/kg (derecha) en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (arriba) o del donante D (abajo) (n = 8 ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra con la última observación realizada (LOCF). B. Concentraciones séricas (ng/ml) de las moléculas indicadas en las dosis indicadas el día 23 o 30 después del tratamiento (en la exposición total, ya sea

antes de la tercera dosis (día 23) o una semana después) en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (arriba) o del donante D (abajo) (n = 3-6 ratones/grupo). La concentración de moléculas se determinó usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano (un método para cuantificar IgG humana anti-BCMA). Se muestran la media $\pm$ DE, donde los valores dentro de las barras representan las concentraciones medias y los valores superiores representan las diferencias.

Figura 29. El tratamiento con candidatos CD3/BCMA/CD38 a 0,5 mg/kg conduce a la regresión completa del tumor KMS-12-BM en un donante de PBMC. Los ratones hembra NSG fueron injertados el día -9 sc con 1×10^7 células tumorales MM KMS-12-BM (CD38^{low} y BCMA^{low}) e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante C: n = 8 ratones/grupo y Donante D: n = 8 ratones/grupo). Los ratones fueron aleatorizados el día -1 cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 120 mm³ y tratamientos inyectados por vía intravenosa una vez por semana durante 3 semanas en los días 0, 7 y 14. A. Crecimiento del tumor KMS-12-BM después del tratamiento con una dosis de 0,5 mg/kg en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (izquierda) o del donante D (derecha) (n = 8 ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra con la última observación realizada (LOCF). B. Concentraciones séricas (ng/ml) de las moléculas indicadas el día 6 después del

tratamiento (después de una inyección intravenosa) en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (izquierda) o del donante D (derecha) (n = 3-4 ratones/grupo). La concentración de moléculas se determinó usando un ELISA de
5 captura de antígeno específico de BCMA humano (un método para cuantificar IgG humana anti-BCMA). Se muestran la media $\pm$ DE, y los valores dentro de las barras representan las concentraciones medias.

Figura 30. La eficacia del tratamiento de los
10 candidatos CD3/BCMA/CD38 se correlacionó con el grado de infiltración de células T y el estado de activación dentro del microambiente tumoral. Los ratones hembra NSG injertados con células tumorales MM KMS-12-BM e inoculados ip con PBMC de 2 donantes humanos sanos
15 (Donante C y Donante D) fueron tratados con una dosis única iv de moléculas a 0,5 mg/kg el día 0, cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 120 mm³. Después de 2 o 6 días, se recolectaron los tumores y los bazos de los ratones tratados y se analizaron ex vivo
20 mediante citometría de flujo (n = 2-3 ratones/grupo/punto temporal). A. Los gráficos de histograma muestran la expresión de TCR $\alpha\beta$ humano en células CD45+ humanas seleccionadas el día 2 (izquierda) y 6 (derecha) después de una dosis única en el tumor. Los números indican el %
25 de células positivas. Leyenda de arriba a abajo: Vehículo, 83A10-TCBcv, CD3/BCMA/CD38-118, CD3/BCMA/CD38-

119, CD3/BCMA/CD38-122. B. El gráfico muestra el número de células TCR $\alpha\beta$ humanas por gramo de tumor en el día indicado y el donante de PBMC. Se muestran la media $\pm$ SD. C. Los gráficos de contorno muestran la expresión de CD69 humano vs. CD25 humano en células T CD8+ infiltradas en tumores el día 2 después de la dosificación con las moléculas indicadas. Los números dentro de los gráficos indican porcentajes. D. Los gráficos muestran el % de células T CD8 positivas para CD69 (izquierda) y CD25 (derecha) humanas en el tumor (arriba) y en el bazo (abajo) el día 2 después de la dosis única. Se muestran la media $\pm$ SD.

Figura 31. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 inducen la secreción de citocinas citotóxicas humanas en el microambiente tumoral. Los ratones hembra NSG injertados con células tumorales MM KMS-12-BM e inoculados ip con PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante C y Donante D) fueron tratados con una dosis única iv de moléculas a 0,5 mg/kg el día 0, cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 120 mm³. Después de 2 o 6 días, se recolectaron los tumores de los ratones tratados y se recuperó el sobrenadante del tumor. El análisis de detección de citocinas se realizó en el sobrenadante del tumor usando Luminex con un kit humano Cytokine & Chemokine 34-Plex (n = 2-3 ratones/grupo/punto temporal). Los gráficos muestran la concentración (en ng) de la citocina indicada en el

sobrenadante del tumor normalizada por gramo de tumor el día 2 o 6 después de la dosificación con las moléculas indicadas. Se muestran la media $\pm$ SD.

Figura 32. Evaluación farmacocinética de CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 en ratones SCID TG32. A ratones SCID TG32 se les inyectó por vía intravenosa una dosis única de CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 a 5 mg/kg y se evaluó la concentración de TREAT en el plasma. Los datos se representan gráficamente como media $\pm$ DE de 6 ratones.

Figura 33. CD3/BCMA/CD38-118 se une a las células T que expresan CD3. Se evaluó la unión de los puntos de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3 $\times$ BCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab mediante citometría de flujo en células T humanas aisladas. Cada punto es la media $\pm$ desviación estándar de cinco a seis donantes de dos experimentos individuales. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 34. CD3/BCMA/CD38-118 se une a líneas celulares que muestran una expresión variable de CD38 y BCMA o que carecen de un antígeno. Se evaluó la unión de los marcadores CD3/BCMA/CD38-118 y CD3 $\times$ BCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y Teclistamab mediante citometría de flujo en diferentes líneas celulares que mostraban expresión variable de CD38 y BCMA, KMS-12-BM (A), MOLP-8 (B), NCI-H929 WT (C), NCI-H929 BCMA KO (D), NCI-H929 CD38 KO E.

Cada punto es la media +/- desviación estándar de tres mediciones de tres experimentos individuales. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

5 Figura 35. CD3/BCMA/CD38-118 muestra mayores uniones a líneas celulares que muestran expresión variable de CD38 y BCMA en comparación con las moléculas de control que carecen del aglutinante BCMA o CD38. La unión de CD3/BCMA/CD38-118 y los controles,
10 CD3/BCMA/CD38-149 y CD3/BCMA/CD38-151, se evaluó mediante citometría de flujo en diferentes líneas celulares que mostraban expresión variable de CD38 y BCMA, KMS-12-BM (A), MOLP-8 (B), NCI-H929 WT (C), NCI-H929 BCMA KO (D), NCI-H929 CD38 KO ©. Cada punto es la media +/- desviación
15 estándar de tres mediciones de tres experimentos individuales. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 36. CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de KMS-12-BM en ausencia o presencia de
20 factores solubles individuales. Se evaluó la capacidad de los puntos de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab para desencadenar la muerte mediada por células T de KMS-12-BM en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 en
25 ausencia o presencia de factores solubles individuales y se midió por citometría de flujo después de 48 horas de

incubación. Porcentajes de muerte respecto a ningún Ab y valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte asociada (EC_{50}) se determinaron a partir del ensayo de lisis redirigida. Cada punto representa el valor de EC_{50} para un donante individual. La barra muestra la media del conjunto de datos. Las medias se compararon usando un modelo de efectos mixtos (cuando faltaban algunos valores) o un análisis ANOVA unidireccional pareado (cuando se incluyeron todos los valores) seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. # valor $p < 0,0001$ **** para CD3/BCMA/CD38-118 vs. todas las demás moléculas con factores solubles. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 37. CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de KMS-12-BM en ausencia o presencia de factores solubles individuales. Se evaluó la capacidad de los puntos de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab para desencadenar la muerte mediada por células T de KMS-12-BM en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 en ausencia o presencia de factores solubles individuales y se midió por citometría de flujo después de 48 horas de incubación. Porcentajes de citotoxicidad y valores de la mitad de concentración máxima efectiva de muerte asociada (EC_{50}) se determinaron a partir del ensayo de lisis redirigida. Cada punto representa el valor de EC_{50} para un

donante individual. La barra muestra la media del conjunto de datos. Las medias se compararon usando un modelo de efectos mixtos (cuando faltaban algunos valores) o un análisis ANOVA unidireccional pareado (cuando se incluyeron todos los valores) seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. # valor $p < 0,0001$ **** para CD3/BCMA/CD38-118 vs. todas las demás moléculas con factores solubles. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 38. CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de KMS-12-BM en presencia de factores solubles competitivos. Se evaluó la capacidad de los puntos de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCM A 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab para desencadenar la muerte mediada por células T de KMS-12-BM en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 en ausencia (izquierda, símbolo blanco vacío) o presencia de una combinación de factores solubles (derecha; BCMA soluble, CD38 soluble y APRIL, símbolo negro completo) y medido por citometría de flujo después de 48 horas de incubación. Porcentajes de muerte respecto a ningún Ab, porcentajes de citotoxicidad y valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte asociada (EC_{50}) se determinaron a partir del ensayo de lisis redirigida. Cada punto representa el valor de EC_{50} para un donante individual. La barra muestra la media del conjunto de

datos. Las medias se compararon usando un modelo de efectos mixtos (cuando faltaban algunos valores) o un análisis ANOVA unidireccional pareado (cuando se incluyeron todos los valores) seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 39. CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente contra todas las líneas celulares. Se evaluó la capacidad de los puntos de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab para desencadenar la muerte mediada por células T de líneas celulares de mieloma múltiple en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 usando células T aisladas en células KMS-12-BM (A, D), MOLP-8 (B, E) y NCI-H929 (C, F) y se midió por citometría de flujo después de 48 horas de incubación. Porcentajes de muerte respecto a ningún Ab (A, B, C), porcentajes de citotoxicidad (D, E, F) y valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte asociada (EC_{50}) se determinaron a partir del ensayo de lisis redirigida. Cada punto representa el valor de EC_{50} para un donante individual. Las líneas muestran la media del conjunto de datos. Las medias se compararon usando un modelo de efectos mixtos (cuando faltaban algunos valores) o un análisis ANOVA unidireccional pareado (cuando se incluyeron todos los valores) seguido de una

comparación post-hoc de Tukey HSD. Ns: no estadísticamente diferente; *: $p=0,05-0,01$; **: $p=0,01-0,001$; ***: $p=0,001-0,0001$; ****: $p<0,0001$. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 40. CD3/BCMA/CD38-118 induce una mayor potencia de muerte contra todas las líneas celulares en comparación con la combinación de anticuerpos biespecíficos con los mismos aglutinantes. La capacidad de CD3/BCMA/CD38-118 y controles, CD3/BCMA/CD38-149, CD3/BCMA/CD38-151 y una combinación de ambos, para desencadenar la muerte mediada por células T de líneas celulares de mieloma múltiple se evaluó en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 usando células T aisladas en células KMS-12-BM (A, D), MOLP-8 (B, E) y NCI-H929 (C, F) y se midió por citometría de flujo después de 48 horas de incubación. Porcentajes de muerte respecto a ningún Ab (A, B, C), porcentajes de citotoxicidad (D, E, F) y valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte asociada (EC_{50}) se determinaron a partir del ensayo de lisis redirigida. Cada punto representa el valor de EC_{50} para un donante individual. La barra muestra la media del conjunto de datos. Las medias se compararon usando un modelo de efectos mixtos (cuando faltaban algunos valores) o un análisis ANOVA unidireccional pareado (cuando se

incluyeron todos los valores) seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. Ns: no estadísticamente diferente; *: $p=0,05-0,01$; **: $p=0,01-0,001$; ***: $p=0,001-0,0001$; ****: $p<0,0001$. NO: no cuantificable. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 41. CD3/BCMA/CD38-118 demuestra una muerte estadísticamente superior a la combinación de teclistamab con daratumumab. Se evaluó la capacidad de CD3/BCMA/CD38-118 y los puntos de referencia, daratumumab, teclistamab y una combinación de ambos, para desencadenar la muerte de líneas celulares de mieloma múltiple en un ensayo MmoAK con una relación efector-diana de 5:1 usando PBMC humanos en células KMS-12-BM y se midió por citometría de flujo después de 48 horas de incubación. Se evaluaron dos concentraciones, 10 (A, C) y 100 (B, D) pM de CD3/BCMA/CD38-118 o teclistamab con una dosis única de daratumumab a 100 nM. Se evaluaron el porcentaje de muerte respecto a ningún Ab (A, B) y el porcentaje de citotoxicidad (C, D) después de la incubación. Cada punto representa un donante individual. Las barras muestran la media del conjunto de datos. Las medias se compararon usando un análisis ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD. Ns: no estadísticamente diferente; *: $p=0,05-0,01$; **: $p=0,01-0,001$; ***: $p=0,001-0,0001$; ****: $p<0,0001$. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 42. CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte de células CD138+ en muestras de pacientes con MM. BMMC de cuatro donantes individuales (A, MM latente; B, MM recién diagnosticado; C, MM r/r; D, leucemia de células plasmáticas (PCL)) se cultivaron en suero humano RPMI al 10 %, 3 ng/ml de IL-6 humana recombinante y se trataron con concentraciones variables de CD3/BCMA/CD38-118, referencia (Teclistamab) y control negativo (CD3/BCMA/CD38-085, no se muestra) durante 17-22 horas. Se extrajeron recuentos absolutos de células CD138+ vivas y se normalizaron a la condición sin anticuerpos para calcular el porcentaje de muerte en comparación con la condición sin anticuerpos. Cada punto representa la media +/- el error estándar de la media de 2 mediciones replicadas para un donante individual (excepto para B y C donde se usaron simplificados). La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 43. CD3/BCMA/CD38-118 induce una muerte superior de células CD138+ a teclistamab en muestras de pacientes con MM. Se cultivaron BMMC de seis a once donantes individuales en suero humano RPMI al 10 %, 3 ng/ml de IL-6 humana recombinante y se trataron con concentraciones variables de CD3/BCMA/CD38-118, referencia CD3xBCMA (Teclistamab) y controles negativos (no se muestran) durante 17-22 horas. Se extrajeron recuentos absolutos de células CD138+ vivas y se

normalizaron a la condición sin anticuerpos para calcular el porcentaje de muerte en comparación con la condición sin anticuerpos. Cada punto representa un donante individual. Las barras muestran las medias +/- desviación estándar de los diferentes donantes para concentraciones específicas. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 22.

Figura 44. Mientras que CD3/BCMA/CD38-118 controla los tumores KMS-12-BM de manera dependiente de la dosis, BEAT CD3/CD38 y Teclistamab no logran retrasar la progresión del tumor en dosis altas. Los ratones hembra NSG fueron injertados el día -9 sc con 1×10^7 células tumorales MM KMS-12-BM (CD38 bajo y BCMA bajo) y se inoculó ip con 1×10^7 PBMC de un donante humano sano (Donante C). Los ratones fueron aleatorizados el día -1 cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 187 mm^3 y tratamientos inyectados por vía intravenosa una vez por semana durante 3 semanas en los días 0, 7 y 14. A. Crecimiento del tumor KMS-12-BM después del tratamiento con CD3/BCMA/CD38-118 (arriba); BEAT CD3/CD38 (centro) o Teclistamab (abajo) en las dosis indicadas en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C ($n = 8$ ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra con la última observación realizada (LOCF). B. Crecimiento del tumor KMS-12-BM después del tratamiento con las moléculas indicadas en dosis de 0,5 mg/kg (izquierda) o 0,1 mg/kg (derecha) en

ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (n = 8 ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra con la última observación realizada (LOCF). C. Concentraciones séricas (ng/ml) de las moléculas indicadas en las dosis indicadas el día 13, 14 o 21 (en el punto mínimo de exposición, ya sea antes de la tercera dosis (día 13/14) o una semana después) en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (n = 4-7 ratones/grupo). Se muestran la media $\pm$ DE, donde los valores dentro de las barras representan las concentraciones medias y los valores superiores representan las diferencias. NIC = sin concentración interpolada.

Figura 45. Dosis altas de BEAT CD3/CD38 y Teclistamab inducen la reducción del compartimento de células T dentro del microambiente tumoral y en la periferia. Los ratones hembra NSG injertados con células tumorales MM KMS-12-BM e inoculados ip con PBMC de un donante humano sano (Donante C) fueron tratados iv con las moléculas indicadas en las dosis indicadas el día cero, cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 187 mm³, y después una vez por semana durante 3 semanas. El día 13, se extrajeron tumores y bazo de los ratones tratados y se analizaron ex vivo mediante citometría de flujo (n = 2-3 ratones/grupo). A. Los gráficos de pseudocolor en escala de grises muestran la expresión de CD45 humano vs. CD45 de ratón en células

vivas seleccionadas en el tumor. Los números dentro de los gráficos indican porcentajes de células positivas. B. Los gráficos de contorno muestran la expresión de TCRab humano en células CD45+ infiltradas en tumores. Los números dentro de los gráficos indican porcentajes de células positivas. C. Los gráficos representan el número de células humanas CD45+ (arriba) y TCRab+ (abajo) por gramo de tumor. Se muestran la media $\pm$ SD. D. Los gráficos representan el número de células humanas CD45+ (arriba) y TCRab+ (abajo) en el bazo de ratones tratados. Se muestran la media $\pm$ SD.

Figura 46. El tratamiento con BEAT CD3/CD38+ IVIG rescató el compartimento de células T y mejoró la eficacia in vivo contra los tumores KMS-12-BM. Los ratones hembra NSG fueron injertados el día -9 sc con 1×10^7 células tumorales MM KMS-12-BM e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de un donante humano sano (Donante E). Los ratones fueron aleatorizados el día -1 cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 120 mm^3 y se inyectó por vía intravenosa el mismo día con 200 mg/kg de IVIG (Privigen) o PBS, y después dos veces por semana. La dosificación (iv) del vehículo, CD3/BCMA/CD38-118 a 0,5 mg/kg o BEAT CD3/CD38 a 0,5 mg/kg se realizó el día cero y el día siete. A. Curvas de crecimiento del tumor KMS-12-BM después del tratamiento con las moléculas indicadas en presencia o ausencia de IVIG en ratones NSG

inoculados con PBMC del donante E ($n = 3-5$ ratones/grupo). Se muestran la media $\pm$ SEM. B. Volumen tumoral de los tumores KMS-12-BM el día 11 después del tratamiento (punto final del estudio) con las moléculas indicadas $\pm$ IVIG. Se muestra la media $\pm$ DE. C, D. El día 11, se extrajeron tumores y bazos de los ratones tratados y se analizaron ex vivo mediante citometría de flujo ($n = 3-5$ ratones/grupo). C. Los gráficos de pseudocolor en escala de grises muestran la expresión de CD45 humano vs. CD45 de ratón en células vivas seleccionadas en el tumor. Los números dentro de los gráficos indican porcentajes de células positivas. D. Los gráficos representan el número de células CD45⁺ humanas dentro de células vivas controladas (arriba) y células TCRab⁺ humanas en células CD45⁺ humanas controladas (abajo) por gramo de tumor (Figura 45D) o en el bazo (Figura 45D (continuación)) de los ratones tratados. Se muestran la media $\pm$ SD.

Figura 47. En presencia de IVIG, CD3/BCMA/CD38-118, BEAT CD3/CD38 y Teclistamab inducen la regresión de los tumores KMS-12-BM en las dosis más altas. Los ratones hembra NSG fueron injertados el día -9 sc con 1×10^7 células tumorales MM KMS-12-BM e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de un donante humano sano (Donante C). Los ratones fueron aleatorizados el día -1 cuando el volumen tumoral promedio alcanzó alrededor de 147 mm^3 y se inyectó por vía intravenosa el mismo día con 200 mg/kg de IVIG (Privigen),

y después una vez por semana durante 3 semanas (día -1, 6 y 13). La dosificación (iv) de vehículo, CD3/BCMA/CD38-118 y BEAT CD3/CD38 a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg y Teclistamab a 2,5, 0,5 y 0,1 mg/kg se realizó los días 0, 7 y 14 (una vez por semana durante 3 semanas). A. Crecimiento del tumor KMS-12-BM después del tratamiento con CD3/BCMA/CD38-118 (arriba); BEAT CD3/CD38 (centro) o Teclistamab (abajo) en las dosis indicadas en ratones NSG inoculados con PBMC de donante C (n = 6-8 ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra con la última observación realizada (LOCF). B. Crecimiento del tumor KMS-12-BM después del tratamiento con las moléculas indicadas en dosis de 0,5 mg/kg (izquierda) o 0,1 mg/kg (derecha) en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (n = 6-8 ratones/grupo). La media $\pm$ SEM se muestra con la última observación realizada (LOCF). C. Concentraciones séricas (ng/ml) de las moléculas indicadas en las dosis indicadas el día 21 (en la exposición total, 1 semana después de 3^{ra} dosis) en ratones NSG inoculados con PBMC del donante C (n = 6-8 ratones/grupo). Se muestran la media $\pm$ DE, donde los valores dentro de las barras representan las concentraciones medias y los valores superiores representan las diferencias. NIC = concentración sin interpolación; BLOQ = por debajo del límite de cuantificación.

Figura 48. Competencia de CD3/BCMA/CD38-118 con isatuximab y daratumumab para la unión a CD38 humano recombinante mediante interferometría de biocapa de octetos. La proteína humana biotinilada CD38-avi-his se cargó en un biosensor de estreptavidina SA. El biosensor cargado con CD38 se sumergió en una solución de anticuerpo 1 a 200 nM en regulador cinético para alcanzar la saturación de la superficie. Después, el biosensor saturado se sumergió en una solución premezclada de anticuerpo 1 y anticuerpo 2 a una concentración final de 200 nM cada uno (fase de competencia). Se realizó el mismo procedimiento experimental usando una solución de anticuerpo 1 a 400 nM solo en la fase de competencia como control de saturación de la superficie. La gráfica muestra la unión a la punta del sensor como un cambio de longitud de onda (respuesta, en nm; eje y) vs. tiempo (eje x) para A) isatuximab y B) daratumumab como anticuerpo 1 (anticuerpo saturante), respectivamente. Las curvas se etiquetan mediante nombre de anticuerpo.

Figura 49. Dibujo esquemático de anticuerpos triespecíficos CD3/BCMA/CD38 adicionales. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se construyeron con tres Fab dirigidos a tres antígenos separados, mediante lo cual el dominio Fab “Fc distal” se fusionó al extremo N del dominio VH del Fab “Fc proximal”. En esta configuración D, CD3/BCMA/CD38, el brazo de unión de CD3 en la posición externa, distal Fc del brazo

B y el aglutinante CD38 en la posición “proximal Fc” del brazo B, mientras que el aglutinante BCMA se coloca en el brazo A.

Figura 50 La posición de los aglutinantes en los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 afecta su potencia citotóxica. Se evaluó la capacidad de CD3/BCMA/CD38-118 y los anticuerpos de control CD3/BCMA/CD38-149, -151, -170, -171 y -172 para desencadenar la muerte mediada por células T de células tumorales KMS-12-BM en un ensayo de lisis redirigida con una relación efector-diana de 5:1 usando células T aisladas. Se muestra el porcentaje de citotoxicidad a diferentes concentraciones para CD3/BCMA/CD38-149 y CD3/BCMA/CD38-171, A; CD3/BCMA/CD38-151 y CD3/BCMA/CD38-172, B; CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-170, C. Cada curva es un modelo logístico no lineal 4PL con pendiente variable y los símbolos representan la media $\pm$ SEM para seis donantes de células T individuales. Los porcentajes de muerte se compararon usando un análisis ANOVA de dos vías pareado seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak (*: $p = 0,05-0,01$; **: $p=0,01-0,001$; ***: $p0,001-0,0001$; ****: $p<0,0001$). La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 25b.

Figura 51. La posición de los aglutinantes en los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 afecta su activación de células T fuera del tumor. Se evaluó la propensión de

CD3/BCMA/CD38-118 y los anticuerpos de control CD3/BCMA/CD38-149, -151, -170, -171 y -172 a inducir la activación de células T fuera del tumor en la diana midiendo la regulación positiva del marcador de activación CD25 en células T CD8+ en un ensayo de PBMC de alta densidad. Se muestra el porcentaje de células T CD8+ que expresan CD25 para CD3/BCMA/CD38-149 y CD3/BCMA/CD38-171, A; CD3/BCMA/CD38-151 y CD3/BCMA/CD38-172, B; CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-170, C. Cada curva es un modelo logístico no lineal 4PL con pendiente variable y los símbolos representan la media +/- SEM para seis donantes individuales. Los porcentajes de células T CD8+ que expresan CD25 se compararon usando un análisis ANOVA de dos vías pareado seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak (*: $p = 0,05-0,01$; **: $p=0,01-0,001$; ***: $p0,001-0,0001$; ****: $p<0,0001$). La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 25b.

Figura 52. Estructura cristalina de CD38 humano en complejo con el anti-CD38-B3. (A) La estructura general del complejo anti-CD38-B3/hsCD38. hsCD38 está sombreado en gris claro, la cadena pesada Fab en negro y la cadena ligera Fab en gris. (B) Huella de anti-CD38-B3 en CD38 resaltando los residuos de CD38 que interactúan con B3. Los residuos subrayados corresponden a residuos compartidos entre el epítipo de B3 y daratumumab. Los residuos en

cursiva y subrayados corresponden a residuos compartidos entre el epítipo de anti-CD38-B3 e isatuximab. (C) Representación de la superficie del epítipo anti-CD38-B3 en CD38 con cadenas laterales de residuos interactuantes de B3 mostrados como barras. HCDR en gris oscuro y LCDR en gris. La configuración experimental y el análisis se describen en el Ejemplo 26.

Figura 53. Anti-CD38-B3, isatuximab y daratumumab se unen a un epítipo distinto en CD38. (A) Los modos de unión de Fab de anti-CD38-B3 y daratumumab (PDB 7DHA). (B) Los modos de unión de Fab de anti-CD38-B3 e isatuximab (PDB 4CMH). La cadena ligera del Fab de anti-CD38-B3 choca estéricamente con la cadena pesada de isatuximab. La colisión estérica de los dos anticuerpos se indica con una elipse discontinua. (C) Representación superficial de los epítipos de anti-CD38-B3 (gris oscuro) e isatuximab (gris) en CD38 con residuos compartidos en ambos epítipos resaltados.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-CD3

Materiales y métodos

Proteína CD3γε humana recombinante (sec. con núm. de ident.: 606)

El complejo CD3 γ -CD3 ϵ (que comprende los residuos 23-103 para CD3 γ , un enlazador y los residuos 23-118 para CD3 ϵ , en adelante denominado proteína humana recombinante CD3 $\gamma\epsilon$) se expresó como una proteína de fusión en un sistema de expresión de *E. coli* de acuerdo con la información publicada (Arnett et al., 2004, PNAS, 101 (46): 16268-16273). La proteína se replegó a partir de los cuerpos de inclusión y se purificó mediante cromatografía de afinidad (usando una resina de afinidad generada con el anticuerpo monoclonal OKT3) y cromatografía de exclusión por tamaño.

La proteína CD3 $\gamma\epsilon$ humana recombinante se biotiniló usando el kit EZ-link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin No-Weigh™ Format (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: A39257). En pocas palabras, la proteína CD3 $\gamma\epsilon$ humana recombinante se dializó a 4 °C contra un regulador de acetato de pH 5.0 seguido de una incubación con un exceso molar de 50 veces de biotina durante 2 horas en hielo. Después, la proteína CD3 $\gamma\epsilon$ humana recombinante se dializó contra PBS a 4 °C.

Expresión transitoria de CD3 $\epsilon\delta$ humano de longitud completa, C 3 $\epsilon\gamma$ humano y C 3 $\epsilon\delta$ de mono cynomolgus en la línea celular CHO-S

Secuencias de dominio extracelular optimizadas por codones humanos de Cd3 ϵ humano (Uniprot ID P07766

residuos 1-126), CD3δ humano (Uniprot ID P04234 residuos 1-105), CD3γ humano (Unipro ID P09693 residuos 1-116), Cd3ε de mono cynomolgus (Uniprot ID Q95LI5 residuos 1-105) y CD3δ de mono cynomolgus (Uniprot ID Q95LI8 residuos 1-117),
5 cada uno fusionado a parte del dominio extracelular, dominio transmembrana completo y dominio citosólico de CD80 de ratón (Uniprot ID Q00609 residuos 237-306) dieron como resultado las construcciones que comprenden secuencias como las proporcionadas en la sec. con núm. de ident.: 610-614.
10 Para la expresión de proteínas, los plásmidos fueron cotransfectados (sec. con núm. de ident.: 611 con sec. con núm. de ident.: 612; sec. con núm. de ident.: 610 con sec. con núm. de ident.: 612 o sec. con núm. de ident.: 613 con sec. con núm. de ident.: 614) en células CHO-S adaptadas a
15 suspensión (banco de cGMP, Invitrogen, cat. núm.: A1136401) usando polietilenimina (PEI; Polysciences). Brevemente, las células se prepararon a 2 millones de células por ml en CD CHO (Gibco). Las células se transfectaron con una mezcla de ADN-PEI a 37 °C. Cuatro horas después de la transfección,
20 el cultivo celular se diluyó 1:1 en PowerCHO 2 (Lonza) complementado con L-glutamina a 4 mM y se incubó con agitación orbital a 37 °C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. La expresión de los antígenos diana se evaluó mediante el monitoreo de la expresión de la proteína indicadora de eGFP
25 con un microscopio de fluorescencia.

Generación de grupos de células HPB-ALL knockout (KO) de CD3ε

La línea celular HPB-ALL CD3 KO se derivó de las células HPB-ALL originales (DSMZ, cat. núm.: ACC483, Lot15) apuntando al primer exón del gen CD3 usando tecnología de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR)/Cas9, como lo describen Ran et al (Ran et al., 2013, Cell, 154: 1380-1389). La línea celular HPB-ALL se transfectó usando un electroporador Neon (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3, ThermoFisher, cat. núm.: 14-0037-85) y las células CD3 knock-out se clasificaron usando el clasificador Melody FACS (BD) para generar un grupo de células CD3 knock-out. La falta de expresión de CD3 se verificó además mediante citometría de flujo usando Qifikit (DAKO, cat. núm.: K007811-8).

Generación de genotecas

La genoteca usada en la presente descripción fue de origen sintético con una diversidad restringida a la cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) y una cadena ligera Vk3-15/Jk1 fija (sec. con núm. de ident.: 1). La genoteca contenía 4 subgenotecas diferentes basadas en las líneas germinales de anticuerpos VH1-69, VH3-23, VH3-15 y VH3-53. Las CDR se han aleatorizado mediante el uso de

oligonucleótidos trómeros. Los cebadores usados para diversificar los CDR-H1 y CDR-H2 se diseñaron para cada una de las subgenotecas y codificaron la diversidad natural específica de la línea germinal en los residuos Kabat 27-35 y SO-58, respectivamente. La CDR-H3 se ha aleatorizado usando una agrupación de oligonucleótidos que codifica longitudes de 15 CDR-H3 (6-20) y una diversidad de origen natural específica de longitud en los residuos de Kabat 95-102. Se han agrupado fragmentos scFv diversificados para simular la distribución de longitud natural CDR-H3 y clonarse en el pNGLEN (vector fagómico pUC119 modificado de manera interna) y la reacción de ligación resultante se ha electroporado en células TG1 de *E. coli*. Cada subgenoteca tenía una diversidad entre $1,2 \times 10^{10}$ y $1,7 \times 10^{10}$, las cuatro subgenotecas alcanzaron una diversidad total de $5,6 \times 10^{10}$.

Selección de genoteca

Las estrategias de selección consistieron en cuatro rondas de selección usando proteína CD3 recombinante, o dos rondas usando proteína CD3 recombinante seguidas de dos o tres rondas usando células que expresaban CD3.

Partículas de fagos purificadas de subgenotecas individuales o agrupadas (10^{12} unidades formadoras de placa) se bloquearon en 1 ml de solución salina regulada

con fosfato (PBS) que contenía 3 % (p/v) de leche descremada (3 % MPBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). 2 x 100 µl de perlas magnéticas Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen, cat. núm.: 65002) fueron bloqueados en las mismas condiciones. Las fagos se agotaron contra las perlas previamente bloqueadas durante 1 h a TA. La otra alícuota de perlas prebloqueadas se incubó con 100 nM de proteína CD3εδ humana recombinante biotinilada (Creative Biomart, cat. núm.: CD3E y CD3D-377H) o proteína CD3γε humana recombinante biotinilada producida internamente (sec. con núm. de ident.: 606) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se incubaron los fagos agotados con perlas previamente recubiertas durante 2 horas a TA. Las perlas se lavaron cinco veces con PBS que contenía 0,1 % (v/v) de Tween (PBS-Tween 0,1 %) y dos veces con PBS. Los fagos se eluyeron con 100 mM de trietilamina durante 10 min a TA y se neutralizaron con el uso de Tris-HCl 1 M pH 8. Se usaron fagos eluidos para infectar 10 ml de células TG1 de *E. coli* de crecimiento exponencial. Las células infectadas se cultivaron en medio 2YT durante 1 h a 37 °C y 100 rotaciones por minuto (rpm), después se extendieron en placas de agar 2YTAG (medio 2YT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa) y se incubaron durante la noche (ON) a 30 °C. Las colonias se rasparon de las placas en 10 ml de 2YT y se añadió glicerol al

15 % (v/v) para almacenamiento a -80 °C. Las células TGI de las reservas de glicerol se cultivaron a 37 °C y 240 rpm en 2YTAG hasta que la OD a 600 nm alcanzó 0,5. Las células se sobreinfectaron después con el fago auxiliar M13K07 con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 10 durante 1 h a 37 °C y 100 rpm. Después, se cambió el medio de cultivo para 2YTAK (medio 2YT complementado con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de canamicina) y las células se cultivaron adicionalmente ON a 30 °C y 280 rpm. Alternativamente, se usaron fagos eluidos para infectar 2 ml de células TG1 de *E. coli* de crecimiento exponencial. Las células infectadas se cultivaron en medio 2YT durante 1 h a 37 °C y 100 RPM, después se cultivaron en medio 2YT suplementado con 2 % de glucosa durante 1 h a 37 °C y 240 RPM. Después, las células se superinfectaron con el ayudante M13K07 y los fagos producidos como se describió anteriormente. Al día siguiente, se usaron 10 µl de sobrenadante libre de células que contiene fago para la ronda posterior de selección.

Para la selección basada en células, $2-10 \times 10^7$ células sin expresión (CHO, HEK o HPB-ALL knockout de CD3ε) y $2-10 \times 10^7$ células que expresan CD3ε (células HPB-ALL o CHO que expresan transitoriamente los dominios extracelulares unidos a la membrana del CD3ε (sec. con

núm. de ident.: 613) y CD3 δ (sec. con núm. de ident.: 614) de mono cynomolgus se bloquearon con PBS/BSA al 3 % suplementado con 0,1 % de azida para evitar la internalización del receptor durante 1 h a temperatura ambiente. Los fagos se deseleccionaron contra células sin expresión durante 1 h a TA. Después, los fagos deseleccionados se incubaron con células que expresaban CD3 ϵ durante 2 h a TA. Para eliminar los fagos no específicos, las células se lavaron cuatro veces con PBS-Tween 0,1 % y dos veces con PBS. Los fagos se eluyeron con ácido cítrico 76 mM, pH 2.0 durante 10 min a TA y se neutralizaron con el uso de Tris-HCl 1 M pH 8. Se usaron fagos eluidos para hacer crecer exponencialmente células TG1 de *E. coli*. La amplificación del fago se realizó como se describió anteriormente.

Análisis de scFv mediante citometría de flujo

La unión de clones scFv a células CHO que expresan transitoriamente los dominios extracelulares unidos a la membrana de CD3 ϵ (sec. con núm. de ident.: 610) y CD3 δ (sec. con núm. de ident.: 611) o CD3 γ (sec. con núm. de ident.: 612) humanos se evaluó mediante citometría de flujo. Las colonias individuales de *E. coli* de la cuarta o quinta ronda de selección se recogieron y se cultivaron en medio 2YT complementado con 100 μ g/ml de ampicilina y 0,1 % de glucosa en placas de 96 pocillos

profundos. La expresión de scFv se indujo mediante la adición de 0,02 mM de IPTG e incubación ON a 30 °C y 260 rpm. Las células se centrifugaron y se obtuvieron extractos periplásmicos al resuspender los gránulos bacterianos en un regulador TES (50 mM Tris-HCl pH 8; EDTA 1 mM, pH 8; 20 % de sacarosa) seguido de incubación en hielo durante 30 minutos. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación y el scFv que contiene sobrenadantes se usó en el experimento de citometría de flujo. Las células CHO que expresan CD3 y no transfectadas se sembraron a una densidad de 105 células/pocillo en placas de microtitulación. A continuación, las placas se centrifugaron para eliminar el sobrenadante celular y 100 µl de extracto periplásmico diluido previamente 1:1 en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 3 % (p/v) (PBS-BSA 3 %) se añadió a cada pocillo y las placas se incubaron adicionalmente durante 30 min a 4 °C. Después, las células se lavaron con PBS-BSA al 3 % y se incubaron con un anticuerpo anti-c-Myc de biotina-pollo (Gallus Immunotech, cat. núm.: ACMYC-B) diluido a 1:200 en PBS-BSA al 3 % durante 30 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron con PBS-BSA al 3 % y se incubaron con estreptavidina APC (eBioscience, cat. núm.: 17-4317) diluidos a 1:100 en PBS-BSA al 3 % durante 30 min a 4 °C. Finalmente, la fluorescencia

celular se midió mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCalibur (BD biosciences).

Expresión IgG1 LALA

5 Los ADNc que codifican las diferentes regiones constantes de anticuerpos fueron genes sintetizados por GENEART AG (Regensburg, Alemania) y modificados mediante técnicas de biología molecular estándar. Los productos de PCR se digirieron con enzimas de restricción de ADN
10 adecuadas, se purificaron y se unieron en plásmidos modificados pcDNA3.1 (Invitrogen) que portaban un promotor CMV y una poliadenilación de la hormona bovina (poli(A)). Los vectores de expresión también llevaron a oriP, que es el origen de replicación del plásmido del virus de Epstein-
15 Barr, y el péptido líder VJ2C murino para la secreción de la cadena de polipéptido codificada. Para reformatear los clones de la genoteca de scFv en formato de IgG1 LALA humana (IgG1 humana con sustituciones de L234A y L235A, numeración de UE), cada clon de scFv en su vector de
20 genoteca de fagos se usó para amplificar sus ADNc VH individuales mediante PCR, a continuación el producto de PCR VH se clonó en el vector pcDNA modificado 3.1 descrito anteriormente ascendente de un ADNc que codifica un dominio CH1 de cadena pesada IgG1 humana, mientras que la cadena
25 ligera Vk3-15/Jk1 fija (sec. con núm. de ident.: 1) se clonó en el vector pcDNA 3.1 100 modificado descrito

anteriormente ascendente un ADNc que codifica un dominio de cadena ligera constante kappa humana.

Para la expresión de IgG1 LALA, se cotransfectaron cantidades iguales de vectores de cadena pesada y cadena ligera en células HEK293-EBNA adaptadas a la suspensión (ATCC, cat. núm.: CRL-10852) usando polietilenimina (PEI) lineal (Polysciences Inc., cat. núm.: 24314). Típicamente, las células se prepararon a 8 millones de células por ml en RPMI 1640 (Biowest, cat. núm.: L0501) suplementado con 0,1 % de Pluronic F-68 (ThermoScientific, cat. núm.: 24040032). A continuación, las células se transfectaron con una mezcla de DNA-PEI. Cuatro horas después de la transfección, el cultivo celular se diluyó 1:1 en BalanceCD HEK293 (Irvine Scientific, cat. núm.: 91165) suplementado con 4 mM de L-Glutamina e incubado durante 5 días con agitación orbital a 37 °C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. Los sobrenadantes de cultivo libre de células que contenían las proteínas recombinantes se prepararon mediante centrifugación seguida de filtración, y se usaron para purificación adicional. Las proteínas IgG1 LALA se purificaron usando la resina de afinidad de proteína A CaptivA® (Repligen, cat. núm.: CA-PRI-0100). Se añadió resina de afinidad a los sobrenadantes de cultivo filtrados y se incubó en 4 °C con una mezcla suave. Al día siguiente, las perlas de resina se recogieron en columnas de cromatografía Poly-Prep* (Laboratorios Bio-Rad), se

lavaron con PBS y las proteínas recombinantes se eluyeron con un regulador ácido (normalmente glicina 0,1 M pH 3). Después de que la neutralización con 1/10 de volumen de pH de Tris-HCl 8, las preparaciones se intercambiaron con regulador en PBS.

Detección de clones de IgG1 LALA anti-CD3 en células que expresan CD3

La detección de anticuerpos anti-CD3 producidos como IgG1-LALA humana consistió en estudios de unión en líneas celulares HPB-ALL silvestres y HPB-ALL KO (delección de CD3) para selectividad, y en PBMC aislados primarios mediante citometría de flujo.

Unión a células HPB-ALL con deficiencia de CD3ε y HPB-ALL

Las células se sembraron a razón de 1×10^5 células/pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (TPP, cat. núm.: 92097). La placa se centrifugó a 350 g durante 3 min a 4 °C y las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS frío (PBS IX, suplementado con 2,5 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM de EDTA y 0,05 % de azida de sodio) que contenía concentraciones crecientes de anticuerpos de IgG1-LALA anti-CD3. Las células teñidas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces con regulador FACS a 350 g durante 3 minutos y se

resuspendieron en 100 μ l de un cóctel de anticuerpo secundario anti-IgG humano policlonal de cabra PE (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: 12-4998-82) diluido 1/200 en regulador FACS durante 30 min. Después, las
5 células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 100 μ l de regulador FACS que contenía tinción de células muertas SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: S34860) diluido 1/2000. Las muestras se adquirieron en un instrumento CytoFlex (Beckman Coulter). Las células se
10 clasificaron basadas en el tamaño de FSC vs SSC y se excluyeron los restos, los dobletes y las células muertas. Las células se analizaron para determinar la intensidad de fluorescencia media geométrica (geomean) de PE usando el software FlowJo. En las etapas posteriores
15 del análisis solo se consideraron las muestras que mostraban al menos 200 células en la puerta final. Finalmente, los valores de intensidad de fluorescencia de la media geométrica (geomean) de PE se graficaron usando el software Prism (GraphPad) y el estado de unión se
20 resumió en la Tabla 1.

Unión a células T CD4⁺ humanas en PBMC

Las PBMC humanas se recolectaron de capas leucocitarias/filtros de aféresis obtenidos del Centro de
25 Transfusión La Chaux-de-Fonds/Berna (Suiza) mediante aislamiento en gradiente de densidad de Ficoll y se

congelaron el día de la recolección. El día anterior al ensayo, las células se descongelaron en medio RPMI completo precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante la noche a 1×10^6 células/ml. El día del ensayo, las células se sembraron a una concentración de 1×10^5 células/pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. La placa se centrifugó a 350 g durante 3 min a 4 °C y las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS frío que contenía diluciones seriadas de anticuerpos IgG1-LALA anti-CD3 a partir de 800 nM y diluidos 3 o 10 veces. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces con regulador FACS a 350 g durante 3 minutos y se resuspendieron en 100 µl de un cóctel de anticuerpo secundario anti-IgG humano policlonal de cabra PE (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: 12-4998-82, 1/200) y anticuerpo de cotinción para CD4 humano-AlexaFluor700 (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: 56-0048-82, 1/100) diluido en regulador FACS durante 30 minutos. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS que contenía tinción de células muertas SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: S34860) diluido 1/2000. Las

muestras se adquirieron en un instrumento CytoFlex (Beckman Coulter). Las células se clasificaron basadas en el tamaño de FSC vs SSC y se excluyeron los restos, los dobletes y las células muertas. Finalmente, se analizó la población de células T CD4+ para determinar la intensidad de fluorescencia media geométrica (geomean) de PE usando el software FlowJo. Finalmente, los valores de intensidad de fluorescencia de la media geométrica (geomean) de PE se graficaron usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 1A y el estado de unión se resumió en la Tabla 1.

Detección de clones de IgG1 LALA anti-CD3 para la activación de células T

Para evaluar el potencial de los anticuerpos anti-CD3 producidos como IgG1-LALA humana para inducir la activación de células T, se realizaron pruebas adicionales usando un ensayo de activación de células T. Se recubrieron con PBS diluciones seriadas de anticuerpos IgG1-LALA anti-CD3 a partir de 200 nM y diluidos 3 o 10 veces en placas de fondo plano de 96 pocillos (TPP, cat. núm.: 92096). Después las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las células T humanas aisladas congeladas se descongelaron en medio RPMI completo precalentado y reposaron durante la noche a 1×10^6 células/ml. El día del ensayo, las placas se lavaron dos veces en PBS y se

recolectaron las células T primarias, se contaron y se sembraron a 1×10^5 células/pocillo (100 μ l). Después de 48 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂, las placas se centrifugaron (350 g, 5 min), después las células se transfirieron a una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se lavaron y se resuspendieron en 100 μ l de un cóctel de anticuerpos para CD4-PE-eFluor610 humano (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: 61-0049-42, 1/200), CD8-AlexaFluor700 (BioLegend, cat. núm.: 344724, 1/100), CD25-PE y CD69-PE-Cy7 (ThermoFisher Scientific, cat. núms.: 12-0259-42 y 25-0699-42, respectivamente, 1/100) diluidos en regulador FACS e incubados durante 30 min a 4 °C. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 100 μ l de regulador FACS que contenía tinción de células muertas SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: S34860) diluido 1/2000. Las muestras se adquirieron en un instrumento CytoFlex (Beckman Coulter). Las células se clasificaron en función del tamaño FSC vs SSC y se excluyeron los desechos y los dobletes. Finalmente, se seleccionaron las células negativas para la tinción de viabilidad y se analizó la población de CD4⁺ para determinar la intensidad de fluorescencia media geométrica (geomean) de PE usando el software FlowJo. La activación de las células T se determinó evaluando la expresión positiva de CD69 activada por Células T CD4⁺. Porcentajes de valores de

células T CD69⁺ de CD4⁺ activados finalmente se graficaron usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura IB y el estado de unión se resumió en la Tabla 1. Se realizaron un total de ocho experimentos
5 independientes.

Resultados y conclusiones

Selección de expresión de fagos y detección de scFv

10 mediante citometría de flujo

Las genotecas de visualización de fagos basadas en una cadena ligera fija Vk3-15/Jk1 (sec. con núm. de ident.: 1) se compararon con CD3 ϵ y el resultado de la visualización de fagos se examinó mediante citometría de
15 flujo. Se secuenciaron los clones ScFv que mostraban unión específica a células CHO que expresaban CD3 ϵ y se expresaron secuencias únicas como IgG1 LALA para una caracterización adicional.

20 Detección de anticuerpos IgG1 LALA anti-CD3 para la unión de células T y la activación de células T

Los resultados de la Figura 1 y la Tabla 1 muestran que entre los 48 aglutinantes examinados para su unión a líneas celulares HPB-ALL silvestres, HPB-ALL KO
25 (CD3 knock out) y células T, solo un clon, anti-CD3-UCP06-C1 (cadena pesada sec. con núm. de ident.: 34), también

denominado en la presente descripción IgG1 LALA anti-CD3-C1 o anti-CD3-UCP06-C1, mostró una unión consistente a las células T CD4+ (Figura 1A) y demostró especificidad, ejemplificada por la unión a HPB-ALL silvestre pero no a la línea celular HPB-ALL KO CD3 (Tabla 1). La detección de la activación de las células T también confirmó que la mayoría de los clones no inducían la regulación positiva de los marcadores de activación en las células T CD4+ como CD69, excepto el candidato anti-CD3-C1 (Figura 1B).

Algunos clones, como anti-CD3-UCP07-H1, anti-CD3-UCP07-B2, anti-CD3-UCP07-D2, anti-CD3-UCP07-F3 y anti-CD3-UCP07-B4, mostraron una unión no específica y se tiñeron de forma positiva tanto en células HPB-ALL silvestre como en células CD3 KO. Otros dos clones, anti-CD3-UCP05-D1 y anti-CD3-UCP08-B1, mostraron una unión específica a CD3 pero una incapacidad para inducir la activación de las células T. La Tabla 1 resume los candidatos anti-CD3 y el resultado de la evaluación de la unión de CD3 y la activación de células T. La figura 1 muestra la unión y la activación de células T de anti-CD3-C1 y otros candidatos anti-CD3 seleccionados como ejemplo.

Nombre del clon	Cadena pesada del clon sec. con núm. de ident.	Unión in vitro			Activación de células T in vitro
		Unión a HPB-ALL WT a 800 nM	Unión a HPB-ALL CD3 Células KO o CHO que no expresan CD3	Unión a células T CD4+ humanas a 800 nM	Regulación positiva de CD69 en células T CD4+

			a 800 nM		
IgGILALA anti-CD3-UCP02-A3	Sec. con núm. de ident.: 2	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP02-B2	Sec. con núm. de ident.: 3	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP02-D2	Sec. con núm. de ident.: 4	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP02-F2	Sec. con núm. de ident.: 5	Sí	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP02-H2	Sec. con núm. de ident.: 6	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-A3	Sec. con núm. de ident.: 7	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-A4	Sec. con núm. de ident.: 8	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-B1	Sec. con núm. de ident.: 9	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-C1	Sec. con núm. de ident.: 10	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-C3	Sec. con núm. de ident.: 11	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-C5	Sec. con núm. de ident.: 12	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-E1	Sec. con núm. de ident.: 13	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-E2	sec. con núm. de ident.: 14	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-E4	sec. con núm. de ident.: 15	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-F1	sec. con núm. de ident.: 16	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-F2	sec. con núm. de ident.: 17	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-F4	sec. con núm. de ident.: 18	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-G2	sec. con núm. de ident.: 19	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-G3	Sec. con núm. de ident.: 20	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-G4	Sec. con núm. de ident.: 21	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-H2	Sec. con núm. de ident.: 22	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP03-H3	Sec. con núm. de ident.: 23	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-A1	Sec. con núm. de ident.: 24	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-A2	Sec. con núm. de ident.: 25	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-C1	Sec. con núm. de ident.: 26	No	No	No	No

IgGILALA anti-CD3-UCP05-D1	Sec. con núm. de ident.: 27	Sí	No	Sí	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-D2	Sec. con núm. de ident.: 28	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-F1	Sec. con núm. de ident.: 29	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-G2	Sec. con núm. de ident.: 30	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-H1	Sec. con núm. de ident.: 31	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP05-H2	Sec. con núm. de ident.: 32	No	No	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP06-A1	Sec. con núm. de ident.: 33	No	No	NT	No
IgGILALA anti-CD3-UCP06-C1	Sec. con núm. de ident.: 34	Sí	No	Sí	Sí
IgGILALA anti-CD3-UCP07-A1	Sec. con núm. de ident.: 35	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-A3	Sec. con núm. de ident.: 36	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-A4	Sec. con núm. de ident.: 37	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-B2	Sec. con núm. de ident.: 38	Sí	Sí	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP07-B3	Sec. con núm. de ident.: 39	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-B4	Sec. con núm. de ident.: 40	Sí	Sí	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP07-C3	Sec. con núm. de ident.: 41	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-D1	Sec. con núm. de ident.: 42	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-D2	Sec. con núm. de ident.: 43	Sí	Sí	NT	No
IgGILALA anti-CD3-UCP07-E1	Sec. con núm. de ident.: 44	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-E2	Sec. con núm. de ident.: 45	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-F2	Sec. con núm. de ident.: 46	No	No	NT	NT
IgGILALA anti-CD3-UCP07-F3	Sec. con núm. de ident.: 47	Sí	Sí	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP07-H1	Sec. con núm. de ident.: 48	Sí	Sí	No	No
IgGILALA anti-CD3-UCP08-B1	Sec. con núm. de ident.: 49	NT	NT	Sí	No

Tabla 1: Descripción general de los anticuerpos IgG1 LALA anti-CD3 desarrollados y su unión a células HPB-ALL, HPB-ALL CD3 KO y células T CD4+ humanas, así como su

- capacidad para activar y regular positivamente la
expresión de CD69 en células T CD4+. La tabla muestra los
números de identificación de secuencia de cadena pesada
(sec. con núm. de ident.), la unión a HPB-ALL, HPB-ALL
5 CD3 KO y células T CD4+, así como la activación de
células T CD4+ de los anticuerpos IgG1-LALA anti-CD3
desarrollados como se determina a partir de experimentos
de citometría de flujo. NT = no probado.
- 10 Ejemplo 2: Optimización del anticuerpo anti-CD3-C1

Material y métodos

Generación y selección de genotecas

- 15 Se generaron tres genotecas de maduración de
afinidad para el clon anti-CD3-C1 (sec. con núm. de
ident.: 34) al introducir diversidad en la cadena pesada
de las CDR. CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 se aleatorizaron
usando oligonucleótidos de codón NNK degenerados (en
20 donde N es cualquiera de los cuatro
desoxirribonucleótidos y K es G o T) en los residuos
Kabat 27-35, 50-58, 95-101 menos 2, respectivamente. Cada
colección se generó mediante el uso de una agrupación de
oligonucleótidos superpuestos que contienen 5 codones
25 degenerados consecutivos. Los tres productos de PCR
resultantes se clonaron en el pNGLEN (vector fagómico

pUC119 modificado de internamente) y la reacción de ligación resultante se electroporó en *E. coli* células TG1. Las células transformadas se esparcieron en placas de 2YTAG y se incubaron ON a 30 °C. Las colonias se
5 rasparon de las placas en 10 ml de medio 2YT y se añadió glicerol al 15 % (concentración final) para almacenamiento a -80 °C. Las fagos se produjeron y se purificaron mediante dos etapas de precipitaciones con un tercio v/v de 20 % de PEG-6000, 2,5 M de NaCl y se
10 resuspendieron en PBS.

La selección de expresión de fagos se realizó como se describe en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones. Las tres genotecas se incubaron con perlas recubiertas previamente con 100 nM, 50 nM y 10 nM
15 de proteína CD3 $\epsilon\delta$ humana recombinante biotinilada (Creative Biomart, cat. núm.: CD3 ϵ y CD3D-377H) o proteína CD3 $\gamma\epsilon$ humana recombinante biotinilada producida internamente (sec. con núm. de ident.: 606), para la ronda 1, la ronda 2 y la ronda 3, respectivamente.

20

Análisis de afinidad mediante SPR

Se usó análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para confirmar la actividad de unión específica de los clones de scFv. Las mediciones se
25 realizaron en un instrumento Biacore 8K+ (Cytiva Life Sciences) usando el software de control Biacore 8K+ a

25 °C y se analizaron con el software de evaluación Biacore Insight (v3.0). La proteína CD3 ϵ δ humana recombinante (Creative Biomart, cat. núm.: CD3E y CD3D-376H) se diluyó hasta una concentración final de 1 μ g/ml en regulador de acetato pH 4.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530) y posteriormente inmovilizado en la ruta de flujo 2 en los ocho canales, a alrededor de 650-900 unidades de resonancia (abreviado RU) en un chip sensor Serie S CM5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100012) con el uso de un kit de acoplamiento de amina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100050). HBS-EP+ (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100669) se usó como regulador de funcionamiento. Los extractos periplásmicos filtrados se inyectaron directamente en el Chip Sensor CM5 serie S de CD3 ϵ δ humana acoplada covalentemente. Las muestras se inyectaron en las vías de flujo 1 y 2 (la trayectoria de flujo 1 se usó como referencia) a una velocidad de flujo de 30 μ l/min durante 3 min, seguido de un tiempo de disociación de 3 min en regulador de funcionamiento. Después de cada evento de unión, la superficie se regeneró con una solución de 10 mM de glicina pH 1.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100354) inyectado durante 50 s a 30 μ l/min en ambas trayectorias de flujo. Cada medición incluyó muestras de concentración cero, así como extractos periplásmicos scFv irrelevantes para referencia y especificidad, respectivamente.

Afinidad de unión bivalente de IgG1 LALA a CD3 por BLI

Los clones de la genoteca ScFv se reformatearon en IgG1 LALA humana como se describe en el Ejemplo 1. Las afinidades bivalentes aparentes de la IgG1 LALA a la proteína CD3 ϵ δ humana se evaluaron mediante interferometría de biocapa (BLI). Las mediciones se realizaron en un instrumento OctetRED96e (Sartorius) y se analizaron mediante el uso del software de análisis de datos HT, versión 11.1 (Octet, Sartorius). La proteína CD3 ϵ δ humana recombinante biotinilada (Creative Biomart, cat. núm.: CD3E y CD3D-377H) se diluyó a 1 μ g/ml en regulador cinético (Sartorius, cat. núm.: 18-1105) y se inmovilizó subsecuentemente en un Biosensor SA de estreptavidina (ForteBio, cat. núm.: 15-5019), previamente sumergido en regulador cinético durante 10 minutos, hasta un nivel de respuesta de alrededor de 0,5-0,8 nm. El biosensor de estreptavidina recubierto con proteína CD3 ϵ δ humana biotinilada se sumergió primero en un regulador cinético durante 2 minutos (valor inicial), seguido de una segunda inmersión en una solución de IgG1 LALA en concentraciones entre 1,6 nM y 100 nM en regulador cinético durante 5 minutos. La disociación en el regulador cinético se controló durante 10 minutos. Todas las etapas se realizaron a 25 °C y agitando a 1000 RPM. Los biosensores de estreptavidina frescos se

recubrieron con proteína CD3 $\epsilon\delta$ humana biotinilada antes de cada ciclo. Cada medición incluyó muestras de concentración cero para referencia. Los datos experimentales se procesaron usando el modelo de ajuste
5 1:1 sobre asociación y disociación.

Detección de clones de IgG1 LALA anti-CD3 madurados por afinidad para la unión a células que expresan CD3 y para la activación de células T

10 La selección de candidatos anti-CD3 humanos madurados por afinidad de C1 producidos como IgG1-LALA humana fue seguida por estudios de unión similares en la línea celular HPB-ALL silvestre y CD3 knockout (KO) para selectividad, y en PBMC aislados primarios, y estudios de
15 activación en células T aisladas primarias usando citometría de flujo. Se usaron las mismas metodologías y materiales que los descritos en el Ejemplo 1.

Resultados y conclusiones

20 La maduración por afinidad de anti-CD3-C1 (cadena pesada, sec. con núm. de ident.:34) implicó la diversificación de CDR-H1 (posiciones Kabat 27-35), CDR-H2 (posiciones Kabat 50-58) y CDR-H3 (posiciones Kabat 95-101 menos 2) en tres genotecas individuales. Se
25 aislaron los clones de ScFv que tenían una velocidad de desconexión más lenta que el clon anti-CD3-C1 original

medido por SPR. Los clones ScFv se reformatearon y expresaron como IgG1 LALA y afinidad bivalente con CD3 $\epsilon\delta$ humano (Creative Biomart, cat. núm.: Se midió CD3E y CD3D-377H mediante BLI. A partir de esta evaluación, un
5 clon, anti-CD3-C1-UCP01-D6 (cadena pesada sec. con núm. de ident.: 55), también denominado en la presente descripción anti-CD3-C1-D6, tuvo la mayor afinidad por el CD3 $\epsilon\delta$ humano con una constante de disociación (KD) medida en 0,26 nM. Los números de identificación de secuencia de
10 cadena pesada (sec. con núm. de ident.), la afinidad de unión bivalente a CD3 $\epsilon\delta$ humano por Octet BLI, la unión a células T CD4+ humanas evaluada por citometría de flujo y la activación de células T CD4+ evaluada por la regulación positiva del marcador de activación CD69, se
15 informan en la Tabla 2. Todos los aglutinantes anti-CD3 madurados por afinidad de C1 mostraron unión a células que expresaban CD3 (células T CD4+) e indujeron la regulación positiva de marcadores de activación en células T CD4+ como CD69 con una mejora significativa en
20 comparación con el clon anti-CD3-UCP06-C1 parental. Se seleccionaron cinco clones, anti-CD3-C1-UCP01-D6, en la presente descripción también denominado anti-CD3-C1-D6, anti-CD3-C1-UCP01-E10, en la presente descripción también denominado anti-CD3-C1-E10, anti-CD3-C1-UCP01-F10, en la
25 presente descripción también denominado anti-CD3-C1-F10, anti-CD3-C1-UCP01-H10, en la presente descripción también

denominado anti-CD3-C1-H10 y anti-CD3-C1-UCP01-E12, en la presente descripción también denominado anti-CD3-C1-E12, para su incorporación en una molécula herramienta biespecífica de CD3×BCMA para evaluar la muerte 5 redirigida de células T (Ejemplo 3) basándose en la secuencia, la unión y los perfiles de activación de células T. La especificidad para CD3 se confirmó por la falta de unión a la línea celular HPB-ALL CD3 KO (Figura 2).

10

Genoteca de aleatorización de CDR	Nombre del clon	Cadena pesada del clon sec. con núm. de ident.	K _D (nM) de CD3εδ humano bivalente medida por Octet BLI	Unión in vitro a células T CD4+ humanas (MFI) a 800 nM	Activación in vitro de células T CD4+ a 200 nM (%CD69+ a las 48 h)
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-UCP06-C1	Sec. con núm. de ident.: 34	1,75	45182	19 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-B6	Sec. con núm. de ident.: 50	0,88	108571	50 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-B9	Sec. con núm. de ident.: 51	1,04	107775	57 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-C11	Sec. con núm. de ident.: 52	0,91	118548	47 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-D1	Sec. con núm. de ident.: 53	1,73	52800	6 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-D4	Sec. con núm. de ident.: 54	0,62	125939	4 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-D6	Sec. con núm. de ident.: 55	0,26	178361	69 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-E6	Sec. con núm. de ident.: 56	0,45	230552	73 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-E7	Sec. con núm. de ident.: 57	1,53	82786	17 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-E10	Sec. con núm. de ident.: 58	0,84	100374	25 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-E11	Sec. con núm. de ident.: 59	0,93	91829	39 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-E12	Sec. con núm. de ident.: 60	0,41	149337	54 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-F1	Sec. con núm. de ident.: 61	1,08	81291	36 %

CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-F10	Sec. con núm. de ident.: 62	0,47	149830	69 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-F12	Sec. con núm. de ident.: 63	0,66	107956	51 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-G12	Sec. con núm. de ident.: 64	0,70	120639	61 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-H9	Sec. con núm. de ident.: 65	0,87	132976	36 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP01-H10	Sec. con núm. de ident.: 66	0,55	151247	58 %
CDR-H2	IgG1LALA anti-CD3-C1-UCP02-E1	Sec. con núm. de ident.: 67	0,35	150526	56 %

Tabla 2: Descripción general de los candidatos

optimizados anti-CD3-C1 desarrollados y su afinidad

bivalente relativa a la proteína CD3 ϵ δ humana

- 5 recombinante según lo evaluado por Octet BLI, así como su
- unión relativa a las células T CD4+ humanas y su
- capacidad para regular positivamente CD69 en las células
- T CD4+. La tabla muestra los números de identificación de
- 10 secuencia de cadena pesada (sec. con núm. de ident.), la
- genoteca de aleatorización de CDR de la que derivan los
- clones, la afinidad de unión bivalente (KD) a la proteína
- CD3 ϵ δ humana recombinante evaluada por Octet BLI, la
- unión a células T CD4+ humanas evaluada por citometría de
- flujo y el estado de activación de células T CD4+ (% de
- 15 regulación positiva de CD69+ en células T CD4 a las 48 h)
- de candidatos optimizados anti-CD3-C1 en IgG1-LALA.

Ejemplo 3: Expresión y caracterización de moléculas
herramienta para la caracterización optimizada del
ligando CD3-C1

5 Material y métodos

Construcción de vectores de expresión para la expresión
transitoria de células de mamíferos

Los ADNc que codifican total o parcialmente las
10 diferentes cadenas polipeptídicas fueron sintetizados
genéticamente por GENEART (Regensburg, Alemania) o Twist
Biosciences (San Francisco, EE. UU.) y modificados mediante
técnicas estándar de biología molecular. Los productos de
la PCR se ligaron en un plásmido pcDNA3.1 modificado
15 (Invitrogen AG, Zug, Suiza) que portaba un promotor CMV y
una poliadenilación de la hormona bovina (poli(A)) mediante
técnicas estándar de biología molecular. Todas las cadenas
de polipéptidos se clonaron independientemente en un vector
de expresión donde la secreción se impulsa por un péptido
20 líder de la cadena ligera IgGK murina.

Expresión de constructos de anticuerpos en CHO-S
(almacenadas en un banco de cGMP)

Para la expresión de constructos de anticuerpos,
25 las células CHO-S, vectores de cadenas diseñadas y un
vector que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de

Epstein-Barr (VEB) (EBNA-1) se cotransfectaron en células CHO-S (banco de cGMP, Invitrogen, cat. núm.: A1136401), usando polietilenimina (PEI; Polysciences). Típicamente, las células se prepararon a 8 millones de células por ml en medio CD-CHO (Gibco). Las células se transfectaron con una mezcla de ADN-PEI a 37 °C. Cuatro horas después de la transfección, el cultivo celular se diluyó 1:1 en PowerCHO™ 2 (Lonza) complementado con L-glutamina a 4 mM y se incubó durante 14 días con agitación orbital a 32 °C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. Los sobrenadantes de cultivo celular clarificado que contienen las proteínas recombinantes se prepararon mediante centrifugación seguido de filtración, y se usaron para purificación adicional.

15

Expresión de constructos de anticuerpos en células

HEK293-EBNA

Para la expresión de constructos de anticuerpos en células HEK293-EBNA, los vectores de cadenas diseñadas que codifican las cadenas pesadas y ligeras se cotransfectaron en células HEK293-EBNA adaptadas a suspensión (ATCC, cat núm. CRL-10852) usando PEI. Típicamente, las células se prepararon 25 a 8 millones de células por ml en rpmi complementado con 0,1 % de Pluronic F-68. A continuación, las células se transfectaron con una mezcla de DNA-PEI. Cuatro horas

después de la transfección, el cultivo celular se diluyó 1:1 en EX-CELL® 293 complementado con rojo de fenol y L-glutamina a 4 mm y se incubó durante 5 días con agitación orbital a 37 °C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. Los sobrenadantes de cultivo libre de células que contenían las proteínas recombinantes se prepararon mediante centrifugación seguida de filtración, y se usaron para purificación adicional.

10 Purificación de constructos de anticuerpos

Los sobrenadantes (de células HEK293-EBNA o CHO-S) se acondicionaron opcionalmente con 0,1 volumen (V) de fosfato sódico 1 M, pH 6.0, purificación previa o se usaron directamente sin acondicionamiento. Se añadió resina KanCapA (KANEKA, Bélgica) a sobrenadantes acondicionados. Las mezclas se incubaron durante la noche a 4 °C mediante agitación. Después de la incubación, las proteínas unidas se lavaron con 10 volúmenes de columna (CV) de PBS pH 7.4, seguido de 2 CV de acetato de sodio 170 mM, pH 5.0, después se eluyeron en múltiples etapas de 50 mM de acetato de sodio, pH 4.3, 4.1 y/o pH 3.9 y neutralizado con 0,1 V de 1 M Tris-HCl pH 8.0. En esta etapa, las proteínas recombinantes se trasladaron a una segunda etapa de purificación por intercambio catiónico como se describe más adelante, o las fracciones de elución se dializaron con PBS, pH 7.4 o histidina, 25 mM,

pH 6.0, 150 mM NaCl, se filtraron en condiciones estériles y se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño (SE-HPLC) (TSKgel G3000SWXL, 5 μ m, 7,8 mm x 30 cm L, partículas de 5 μ m y poros de 250 Å (Tosoh Bioscience, cat. núm.: 08541) a temperatura ambiente con regulador de fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 6.8 como eluyente a una velocidad de flujo de 1 ml/min en HPLC Alliance 2695 (Waters) o Acquity Arc HPLC (Waters) con calentador de columna y detector UV/Vis (2487 o 2489 de Waters) o detector PDA (2996 o 2998 de Waters)) y SDS-PAGE (NuPAGE Bis-Tris 4-12 % acrilamida, Invitrogen AG, Basilea, Suiza). El eluato con <95 % de pico principal en SE-HPLC o los eluatos sin análisis previo se purificaron aún más mediante cromatografía de intercambio catiónico. La columna HiTrap HP SP (volumen de lecho de 1 ml) se preequilibró en un regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.5 y se operó en un sistema de cromatografía AKTA pure™ (columna e instrumento de Cytiva Life Sciences) a un caudal de 1 ml/min. La elución se realizó usando un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl en acetato de sodio 50 mM, pH 5.5. Las fracciones de elución agrupadas correspondientes al pico principal se analizaron mediante SE-HPLC y SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Se usó el sistema Multi-Cartridge Endosafe-MCS de Charles River que usa un ensayo basado en lisado

de amebocitos de Limulus (LAL) para confirmar un nivel de endotoxina bacteriano inferior a 5 EU/mg. Típicamente, para los anticuerpos purificados, el contenido de formas agregadas fue menor que 5 % y la pureza medida por SE-
5 HPLC fue superior al 94 %.

Ensayo de lisis redirigida (RDL)

La selección de candidatos optimizados anti-CD3-
C1 fue seguida por pruebas en formato para determinar la
10 potencia de muerte de tumores. Se generaron 2+1 BEAT con
aglutinantes BCMA como se describió anteriormente y se
evaluó su potencia de muerte en un ensayo de lisis
redirigida (RDL) usando la línea celular de mieloma
múltiple NCI-H929.

15 Las células mononucleares de sangre periférica
humana (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas de donantes
sanos obtenidas del Centro de Transfusión de La Chaux-de-
Fonds/Berna (Suiza) mediante aislamiento en gradiente de
densidad de Ficoll y se congelaron en medio de congelación
20 de células CryoStor10 (Stemcell, cat. núm.: 07930). Las
células se descongelaron en un medio RPMI completo
precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino
fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de
aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 %
25 de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante
la noche a 1×10^6 células/ml. Diez mil células diana

(línea celular NCI-H929, Sigma, cat. núm.: 95050415) se marcaron con el colorante de proliferación eFluor670 (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: 65-0840-85) y se cocultivaron con cincuenta mil PBMC alcanzando una relación efector-diana de 5:1. Se añadieron diluciones seriadas de 2+1 candidatos anti-CD3-C1-UCP01-X/BCMA (donde X representa las variantes maduradas por afinidad del aglutinante anti-CD3 C1) y anticuerpos de control a partir de 200 nM y diluidos 10 veces y el cocultivo se incubó durante 48 horas, a 37 °C, 5 % de CO₂. Después del período de incubación, la lectura del ensayo RDL se evaluó mediante dos métodos diferentes: midiendo la actividad citotóxica de las células T contra las células diana y midiendo el aumento de la expresión del marcador de activación CD69 en células T CD4⁺. La muerte de células tumorales se determinó midiendo el recuento absoluto de células diana vivas (células eFluor670+) y se calculó como % de muerte diana = $[1 - (\text{recuentos absolutos de muestra}) / (\text{recuentos absolutos en presencia de células diana solamente})] \times 100$. La muerte de células tumorales específicas se calculó como % de muerte específica = % de muerte de la diana (muestra) - % de muerte de la diana no específico (en ausencia de anticuerpos). La activación de las células T se determinó evaluando el porcentaje de células CD69 positivas activadas por células T CD4⁺. Porcentajes de muerte específica y

porcentajes de células T CD69+ de CD4⁺ finalmente se graficaron usando el software Prism (GraphPad).

Resultados y conclusiones

5 Las moléculas de control y herramienta necesarias para comparar la activación de las células T y la potencia de muerte de los nuevos aglutinantes CD3 se diseñaron mediante la combinación de los aglutinantes CD3 como Fab y BCMA doble dAb de la técnica en una estructura principal
10 BEAT Fc silenciada (mutaciones LALA, Hezareh et al., 2001, J Virol, 75(24): 12161-12168) como se muestra en la Figura 3. El control negativo ABC-DUxBCMA tenía un aglutinante irrelevante en lugar del Fab de unión a CD3. Los constructos se produjeron en células CHO-S con los
15 conjuntos de cadenas detallados en la Tabla 3. Todas las moléculas de control se purificaron con proteína A seguido de una purificación opcional mediante cromatografía de intercambio catiónico. Los rendimientos y purezas de las moléculas de control y herramienta se informan en la Tabla
20 4.

Constructo	Cadena 1	Cadena 2	Cadena 3
TNB-F2B BATE Fc	Sec. con núm. de ident.: 571	Sec. con núm. de ident.: 572	Sec. con núm. de ident.: 1
Control negativo = ABC-DUxBCMA	Sec. con núm. de ident.: 519	Sec. con núm. de ident.: 520	Sec. con núm. de ident.: 521
Anti-CD3-C1-UCP01-D6xBCMA	Sec. con núm. de ident.: 515	Sec. con núm. de ident.: 516	Sec. con núm. de ident.: 1
Anti-CD3-C1-UCP01-E10xBCMA	Sec. con núm. de ident.: 509	Sec. con núm. de ident.: 510	Sec. con núm. de ident.: 1

Anti-CD3-C1-UCP01-H10xBCMA	Sec. con núm. de ident.: 513	Sec. con núm. de ident.: 514	Sec. con núm. de ident.: 1
Anti-CD3-C1-UCP01-F10xBCMA	Sec. con núm. de ident.: 511	Sec. con núm. de ident.: 512	Sec. con núm. de ident.: 1
Anti-CD3-C1-UCP01-E12xBCMA	Sec. con núm. de ident.: 517	Sec. con núm. de ident.: 518	Sec. con núm. de ident.: 1
83A10-TCBcv_aCD3xTNB-BCMA BEAT Fc	Sec. con núm. de ident.: 506	Sec. con núm. de ident.: 507	Sec. con núm. de ident.: 508

Tabla 3: Combinaciones de secuencias de moléculas
herramientas y de control usadas para caracterizar la
activación de células T.

5

Constructo	TNB-F2B BEAT Fc	83A10-TCBcv_aCD3xTNB BEAT Fc	Control negativo =ABC-DUxBCMA	Anti-CD3-C1-UCP01-D6xBCMA	Anti-CD3-C1-UCP01-E10xBCMA	Anti-CD3-C1-UCP01-H10xBCMA	Anti-CD3-C1-UCP01-F10xBCMA	Anti-CD3-C1-UCP01-E12xBCMA
Aglutinante CD3	TNB-F2B	83A10-TCBcv_aCD3	ABC-DU	Anti-CD3-C1-UCP01-D6	Anti-CD3-C1-UCP01-E10	Anti-CD3-C1-UCP01-H10	Anti-CD3-C1-UCP01-F10	Anti-CD3-C1-UCP01-E12
Aglutinante BCMA	TNB-BCMA-dAb-dAb	TNB-BCMA-dAb-dAb	TNB-BCMA-dAb-dAb	TNB-BCMA-dAb-dAb	TNB-BCMA-dAb-dAb	TNB-BCMA-dAb-dAb	TNB-BCMA-dAb-dAb	TNB-BCMA-dAb-dAb
Rendimiento (mg/L)	56-78	31	31	18	11	14	10	13
Pureza final (% de monómero)	98-100	99	99	96	96	94	94	96

Tabla 4: Descripción y datos de producción de anticuerpos de control en formato CD3-Fab×BCMA-dAb-dAb usados para la caracterización de la activación de células T y la potencia de muerte de nuevos aglutinantes CD3.

5 Los resultados de la Figura 4 muestran que todos los candidatos desencadenaron la muerte de células tumorales que expresaban BCMA (Figura 4A) y la activación de células T CD4⁺ (Figura 4B). En particular, el candidato 2+1 anti-CD3-C1-UCP01-D6×BCMA mostró la mejor potencia de
10 muerte entre las variantes maduras por afinidad. Es importante destacar que este candidato mostró un perfil similar en comparación con el control positivo 83A10-TCBcv_aCD3×TNB-BCMA BEAT Fc. De manera similar, los datos de activación de células T (Figura 4B) confirmaron la
15 similitud entre el candidato y el control positivo 83A10-TCBcv_aCD3×TNB-BCMA BEAT Fc para inducir la regulación positiva de CD69 en células T CD4⁺ en presencia de células tumorales que expresan BCMA.

20 Ejemplo 4: Mapeo de epítomos para CD3 y dirigidos por IgG1 LALA anti-CD3-C1-D6 usando espectrometría de masas HDX

Materiales y métodos

25 Digestión con pepsina/XIII y LC-MS

El experimento HDX-MS se realizó en una plataforma personalizada que consta de un sistema de automatización HDX personalizado para etiquetado y extinción de deuterio, un Waters Acquity Binary Solvent Manager para digestión y captura de muestras, un segundo Waters Acquity Binary Solvent Manager para gradiente analítico y un espectrómetro de masas Thermo Q Exactive HF para identificación de péptidos y medición de masa.

Se desnaturalizaron 4,3 µg de proteína CD3ye humana recombinante (sec. con núm. de ident.: 606) como se describe en el Ejemplo 1 en 100 µL de regulador de control (fosfato 50 mM, cloruro sódico 100 mM a pH 7.4) añadiendo 100 µL de HCl de guanidina 4 M, TCEP 0,85 M (el pH final fue 2.5) e incubando la mezcla durante 3 min a 4 °C. Después, la mezcla se sometió a digestión con pepsina/XII I en columna usando una columna empacada interna (2,1 x 30 mm, NBA2014002, NovaBioAssays, Woburn, MA). Los péptidos resultantes fueron atrapados y desalinizados en una precolumna ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 5 mm, 186003975, Waters) durante 3,5 minutos a 160 µL/min. Después, los péptidos se eluyeron de la trampa usando un gradiente de acetonitrilo de 2-32 % (con ácido fórmico al 0,3 %) durante 12,5 minutos a una velocidad de flujo de 150 µL/min y se separaron en una columna C8 de 50 x 1 mm (3 pm, NBA2014015, NovaBioAssays). El disolvente A fue ácido

fórmico al 0,3 % en agua. Los péptidos eluidos se analizaron mediante un espectrometría de masas Thermo Q Exactive HF en modo MS/ddMS2 completo. La válvula de inyección, la columna enzimática y sus tubos de conexión 5 relacionados estaban dentro de una caja de enfriamiento mantenida a 4 °C. La segunda válvula de conmutación, la columna C8 y sus tubos de conexión de acero inoxidable relacionados estaban dentro de una caja de circulación refrigerada mantenida a -6 °C. La identificación de 10 péptidos se realizó mediante la búsqueda de datos MS/MS contra la secuencia de la proteína humana recombinante CD3γε (sec. con núm. de ident.: 606) con Protein Metrics. La tolerancia de masa para los iones precursores y del producto fue de 10 ppm y 0,02 Da, respectivamente.

15

HDX con digestión con pepsina/XIII

La IgG1 LALA anti-CD3-C1-D6 se concentró usando un filtro centrífugo Amicon™ Ultra de 0,5 ml y 30 kDa (MilliporeSigma). 10 µL de proteína CD3γe humana 20 recombinante (sec. con núm. de ident.: 606, 4,3 µg) o 10 µL de proteína CD3γe humana recombinante (sec. con núm. de ident.: 606) mezclada con una mezcla de IgG1 LALA anti-CD3-C1-D6 (4,3 µg: Se incubó 18,5 µg) con 90 µL de regulador de marcado de óxido de deuterio (fosfato de 25 sodio 50 mM, cloruro de sodio 100 mM a pD 7.0) durante 0 s, 15 s, 60 s, 600 s y 3600 s a 4 °C. El intercambio de

hidrógeno/deuterio se detuvo añadiendo 100 µL de HCl de guanidina 4 M, TCEP 0,85 M (el pH final fue 2.5). Posteriormente, las muestras enfriadas se sometieron a digestión con pepsina/XIII en columna y análisis LC-MS como se describió anteriormente. Los espectros de masas se registraron solo en modo MS. Los datos MS sin procesar se procesaron usando HDX WorkBench, software para el análisis de datos MS de intercambio H/D (J. Am. Soc. Espectro de masas. 2012, 23 (9), 1512-1521). Los niveles de deuterio se calcularon usando la diferencia de masa promedio entre el péptido deuterado y su forma nativa (t0).

Resultados y conclusiones

El experimento HDX-MS realizado para identificar el epítipo de anti-CD3-C1-D6 dio como resultado una cobertura de secuencia del 100 % para la proteína CD3γ ϵ humana recombinante (sec. con núm. de ident.: 606). La proteína humana recombinante CD3γ ϵ mostró una reducción significativa en la captación de deuterio tras la unión a anti-CD3-C1-D6 en AA182-197, YVCYPRGSKPEDANFY (sec. con núm. de ident.: 726), lo que indica que este era el epítipo principal de la proteína humana recombinante CD3γ ϵ tras la unión a IgG1 LALA anti-CD3-C1-D6. Este péptido pertenecía al péptido CD3 ϵ de la proteína recombinante, lo que indica que sólo la cadena épsilon del constructo estaba

involucrada en la unión a C1-D6. La figura 5 muestra el mapa de calor diferencial que compara el intercambio de hidrógeno/deuterio de la proteína CD3γɛ humana recombinante sola con el de la proteína CD3γɛ humana recombinante mezclada con IgG1 LALA anti-CD3-C1-D6.

Ejemplo 5: Generación de anticuerpos anti-BCMA

Materiales y métodos

10

Expresión transitoria del BCMA de longitud completa de humanos y monos cynomolgus en la línea celular CHO-SV

Las secuencias humanas optimizadas por codones de BCMA humano de longitud completa (secuencia UniProt ID Q02223; residuos 1-184; sec. con núm. de ident.: 615) y del BCMA de mono cynomolgus de longitud completa (secuencia de UniProt ID A0A2K5UD97; residuos 1-183; sec. con núm. de ident.: 616) se clonaron en un plásmido pcDNA™ 3.1 modificado (ThermoFisher Scientific, cat. núm. V79020). Para la expresión de proteínas, los plásmidos se transfectaron en células CHO-S adaptadas a la suspensión (cGMP depositado, Invitrogen, cat. núm: A1136401) usando polietilenimina (PEI; Polysciences). Brevemente, las células se prepararon a 2 millones de células por ml en CD CHO (Gibco). Las células se transfectaron con una mezcla de ADN-PEI a 37 °C. Cuatro horas después de la transfección,

el cultivo celular se diluyó 1:1 en PowerCHO 2 (Lonza) complementado con L-glutamina a 4 mM y se incubó con agitación orbital a 37 °C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. La expresión de los antígenos diana se evaluó mediante el
5 monitoreo de la expresión de la proteína indicadora de eGFP con un microscopio de fluorescencia.

Selección de genoteca

Las estrategias de selección consistieron en
10 cuatro rondas de selección usando proteína BCMA humana recombinante, o dos rondas usando proteína BCMA humana recombinante seguidas de dos rondas usando proteína BCMA de mono cynomolgus recombinante o células CHO que expresaban BCMA de mono cynomolgus.

15 Las partículas de fago purificadas de cada subgenoteca descritas en el Ejemplo 1 se han agrupado ($2,5 \times 10^{11}$ unidades formadoras de placa/subgenoteca) y se bloquearon con solución salina regulada con fosfato (PBS) que contiene 3 % (p/v) de leche descremada (3 % de
20 MPBS) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Se llevaron a cabo dos primeras rondas de selección usando perlas magnéticas Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen, cat. núm.: 65002). Se bloquearon las perlas con solución salina regulada con fosfato (PBS) que
25 contenía 3 % (p/v) de leche descremada (3 % de MPBS) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Los fagos se

deseleccionaron contra las perlas previamente bloqueadas durante 1 h a TA. Los fagos deseleccionados se incubaron con 100 nM de proteína BCMA humana recombinante biotinilada (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-H82E4) durante 2 h a temperatura ambiente. Los fagos unidos al antígeno se capturaron en perlas de estreptavidina durante 30 minutos a TA y las perlas se lavaron cinco veces con PBS que contenía 0,1 % (v/v) de Tween (PBS-Tween 0,1 %) y dos veces con PBS. Los fagos se eluyeron con 100 mM de trietilamina durante 10 min a TA y se neutralizaron con el uso de Tris-HCl 1 M pH 8. Se usaron fagos eluidos para infectar 10 ml de células TG1 de *E. coli* de crecimiento exponencial. Las células infectadas se cultivaron en medio 2YT durante 1 h a 37 °C y 100 rotaciones por minuto (rpm), después se extendieron en placas de agar 2YTAG (medio 2TY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa) y se incubaron durante la noche (ON) a 30 °C. Las colonias se rasparon de las placas en 10 ml de 2YT y se añadió glicerol al 15 % (v/v) para almacenamiento a -80 °C. Las células TGI de las reservas de glicerol se cultivaron a 37 °C y 240 rpm en 2YTAG hasta que la OD a 600 nm alcanzó 0,5. Las células se sobreinfectaron después con el fago auxiliar M13K07 con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 10 durante 1 h a 37 °C y 100 rpm. Después, se cambió el medio de cultivo para

2YTAK (medio 2YT complementado con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de canamicina) y las células se cultivaron adicionalmente ON a 30 °C y 280 rpm. Alternativamente, se usaron fagos eluidos para infectar 5 2 ml de células TG1 de *E. coli* de crecimiento exponencial. Las células infectadas se cultivaron en medio 2YT durante 1 h a 37 °C y 100 RPM, después se cultivaron en medio 2YT suplementado con 2 % de glucosa durante 1 h a 37 °C y 240 RPM. Después, las células se 10 superinfectaron con el ayudante M13K07 y los fagos producidos como se describió anteriormente. Al día siguiente, se usaron 10 µl de sobrenadante libre de células que contiene fago para la ronda posterior de selección.

15 Para la selección contra proteína BCMA recombinante de mono cynomolgus, Protein G Dynabeads® magnéticos (Invitrogen, cat. núm.: 10003D) y 200 nM de IgG1 humana se mezclaron en 3 % de MPBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se deseleccionaron 20 fagos bloqueados contra perlas recubiertas de IgG1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, los fagos se incubaron con 100 nM de proteína de fusión Fc BCMA de mono cynomolgus recombinante (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-C5253) durante 2 h a temperatura ambiente. Los fagos 25 unidos al antígeno se capturaron en perlas de proteína G

durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron las siguientes etapas como se describió anteriormente.

Para la selección basada en células, las partículas de fago purificadas se bloquearon con solución salina regulada con fosfato (PBS) que contenía 3 % (p/v) albúmina sérica bovina (PBS/BSA al 3 %) durante 1 h a TA. 2 x 10⁷ células CHO no transfectadas y 2 x 10⁷ células CHO que expresan transitoriamente la proteína BCMA de monocynomolgus (sec. con núm. de ident.: 616) se bloquearon con PBS/BSA al 3 % complementado con 0,1 % de azida para evitar la internalización del receptor durante 1 hora a TA. Los fagos se deseleccionaron contra células no transfectadas durante 1 h a TA. Después, los fagos deseleccionados se incubaron con las células transfectadas durante 2 h a TA. Para eliminar los fagos no específicos, las células se lavaron cuatro veces con PBS-Tween 0,1 % y dos veces con PBS. Los fagos se eluyeron con ácido cítrico 76 mM, pH 2.0 durante 10 min a TA y se neutralizaron con el uso de Tris-HCl 1 M pH 8. Las siguientes etapas se realizaron como se describe anteriormente.

Análisis de scFv mediante SPR

Se usó análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para confirmar la actividad de unión específica de los clones de scFv. Las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore 8K+ (Cytiva Life

Sciences) usando el software de control Biacore 8K+ a 25 °C y se analizaron con el software de evaluación Biacore Insight (v3.0). La proteína BCMA humana recombinante biotinilada (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-H82E4) o
5 proteína de fusión BCMA Fc de mono cynomolgus recombinante (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-C52H7) se diluyó hasta una concentración final de 10 µg/ml en regulador de acetato pH 4.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530) y posteriormente inmovilizado en la ruta de flujo 2 en los
10 ocho canales, a alrededor de 200 y 250 unidades de resonancia (abreviado RU) respectivamente, en chips de sensores Serie S CM5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100012) con el uso de un kit de acoplamiento de amina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100050). HBS-EP+
15 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100669) se usó como regulador de funcionamiento. Los extractos periplásmicos filtrados se inyectaron directamente en el chip sensor BCMA Serie S CM5 humano acoplado covalentemente o en el chip sensor BCMA Serie S CM5 de mono cynomolgus acoplado
20 covalentemente. Las muestras se inyectaron en las vías de flujo 1 y 2 (la trayectoria de flujo 1 se usó como referencia) a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 3 min, seguido de un tiempo de disociación de 3 min en regulador de funcionamiento. Después de cada evento de
25 unión, la superficie se regeneró con una solución de 10 mM de glicina pH 1.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.:

BR100354) inyectado durante 50 s a 30 μ l/min en ambas trayectorias de flujo. Cada medición incluyó muestras de concentración cero, así como extractos periplásmicos scFv irrelevantes para referencia y especificidad, respectivamente.

Análisis de scFv mediante citometría de flujo

La unión de los clones scFv a las células CHO que expresan transitoriamente la proteína BCMA humana (sec. con núm. de ident. 615) o la proteína BCMA de monomolgus (sec. con núm. de ident. 616) se evaluó mediante citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 1.

Expresión de Fab

Los ADNc que codifican las diferentes regiones constantes de anticuerpos fueron genes sintetizados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) y modificados mediante técnicas de biología molecular estándar. Los productos de PCR se digirieron con enzimas de restricción de ADN adecuadas, se purificaron y se unieron en plásmidos modificados pcDNA3.1 (Invitrogen) que portaban un promotor CMV y una poliadenilación de la hormona bovina (poli(A)). Los vectores de expresión también llevaron a oriP, que es el origen de replicación del plásmido del virus de Epstein-Barr, y el péptido líder VJ2C murino para la secreción de

la cadena de polipéptido codificada. Para reformatar los clones de la genoteca de scFv en fragmentos Fab de IgG1 humana, cada clon de scFv en su vector de genoteca de fagos se usó para amplificar sus ADNc VH individuales mediante PCR, a continuación el producto de PCR VH se clonó en el vector pcDNA modificado 3.1 descrito anteriormente ascendente de un ADNc que codifica un dominio CH1 de cadena pesada IgG1 humana, mientras que la cadena ligera VK3-15/JK1 fija (sec. con núm. de ident.: 1) se clonó en el vector pcDNA 3.1 modificado descrito anteriormente ascendente un ADNc que codifica un dominio de cadena ligera constante kappa humana.

Para la expresión de Fab, se cotransfectaron cantidades iguales de vectores de cadena pesada y cadena ligera en células HEK293-EBNA adaptadas a la suspensión (ATCC, cat. núm.: CRL-10852) usando polietilenimina (PEI) lineal (Polysciences Inc., cat. núm.: 24314). Típicamente, las células se prepararon a 8 millones de células por ml en RPMI 1640 (Biowest, cat. núm.: L0501) suplementado con 0,1 % de Pluronic F-68 (ThermoScientific, cat. núm.: 24040032). A continuación, las células se transfectaron con una mezcla de DNA-PEI. Cuatro horas después de la transfección, el cultivo celular se diluyó 1:1 en BalanceCD HEK293 (Irvine Scientific, cat. núm.: 91165) suplementado con 4 mM de L-Glutamina e incubado durante 5 días con agitación orbital a 37 °C, 5 % de CO2 y 80 % de humedad.

Los sobrenadantes de cultivo libre de células que contenían las proteínas recombinantes se prepararon mediante centrifugación seguida de filtración, y se usaron para purificación adicional. Las proteínas Fab se purificaron con el uso de la matriz de afinidad CaptureSelect™ IgG-CHI (ThermoScientific, cat. núm.: 194320050). Se añadió resina de afinidad a los sobrenadantes de cultivo filtrados y se incubó en 4 °C con una mezcla suave. Al día siguiente, las perlas de resina se recogieron en columnas Poly-Prep (Laboratorios Bio-Rad), se lavaron con PBS y las proteínas recombinantes se eluyeron con un regulador ácido (normalmente glicina 0,1 M pH 3). Después de que la neutralización con 1/10 de volumen de pH de Tris-HCl 8, las preparaciones se intercambiaron con regulador en PBS.

15

Afinidades de unión Fab para BCMA

Se usó resonancia de plasmones superficiales (SPR) para medir las afinidades de unión de los fragmentos Fab para BCMA humano y de mono cynomolgus. Las afinidades se midieron en un instrumento Biacore T200 (Cytiva Life Sciences) a 25 °C y se analizaron con el software de evaluación Biacore T200 (v3.1). Las mediciones se realizaron en Chips Sensores CM5 de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530). Proteína BCMA humana recombinante (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-H522y) y proteína BCMA recombinante de mono cynomolgus

(Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-C52H7) se inmovilizaron covalentemente a aproximadamente 200 RU en la ruta de flujo 2 y la ruta de flujo 3, respectivamente, de la superficie del Chip Sensor con el uso de un kit de acoplamiento de amina comercialmente disponible (Cytiva Life Sciences, cat. 5 núm.: BR100050). Los fragmentos Fab se inyectaron en un solo ciclo cinética a diferentes concentraciones que varían de 15,6 a 1000 nM, en regulador HBS-EP+ (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100669) a un régimen de flujo de 30 10 μ l/min durante 3 min en la ruta de flujo 1, 2, 3 y 4 (trayecto de flujo 1 usado como referencia). La disociación se monitoreó durante 5 minutos. Después de cada ciclo, la superficie de Chips Sensores CM5 de la serie S recubierta con proteínas BCMA recombinantes se regeneró con 30 μ l de 15 glicina 10 mM pH 1.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100354). Los datos experimentales se procesaron mediante el modelo de ajuste cinético de Langmuir 1:1. Las mediciones incluyeron muestras de concentración cero para referencia. Se usaron χ^2 , U- y valores residuales para 20 evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y los modelos de unión individuales.

Ensayo de bloqueo de APRIL y BAFF

Se evaluó la capacidad de los fragmentos Fab 25 para bloquear la interacción entre BCMA humano y APRIL humano, así como entre BCMA humano y BAFF humano mediante

resonancia de plasmón superficial (SPR). Las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore 8K+ (Cytiva Life Sciences) usando el software de control Biacore 8K+ a temperatura ambiente y se analizaron con el software de evaluación Biacore Insight (v3.0). Regulador HBS-EP+ (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100669) se usó como regulador de funcionamiento. La proteína APRIL humana recombinante marcada con His (Acrobiosystems, cat. núm.: APL-H5244) o proteína BAFF humana recombinante marcada con his (Acrobiosystems, cat. núm.: BAF-H5248) se inmovilizó a alrededor de 65 RU o a alrededor de 10 RU respectivamente en la ruta de flujo 2 de un chip sensor CM5 de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530) previamente recubierto con anticuerpo antihistidina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28995056). Una solución premezclada de 50 nM de proteína de fusión Fc de BCMA humana recombinante (Acrobiosystems, cat. núm.: Se inyectó BCA-H5254) y 25 nM Fab en regulador HBS-EP+ durante 3 minutos en la ruta de flujo 1 y la ruta de flujo 2 (la ruta de flujo 1 se usó como referencia) de APRIL humano inmovilizado o de chip sensor BAFF humano inmovilizado, seguido de 3 minutos de disociación en regulador de ejecución. Se realizó el mismo procedimiento experimental usando soluciones premezcladas de 50 nM de proteína de fusión Fc BCMA humana recombinante y 50 nM o 200 nM de Fab o con 50 nM de proteína de fusión Fc BCMA

humana recombinante sola. La superficie del anticuerpo antihistidina se regeneró usando 30 μ l de glicina-HCl 10 mM pH 1.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100354) se inyecta en ambos trayectos de flujo al final de cada
5 ciclo.

Resultados y conclusiones

Los clones ScFv que muestran una unión específica a la proteína BCMA humana recombinante y a la
10 proteína BCMA de mono cynomolgus recombinante por SPR, o clones de scFv que muestran unión específica a células CHO que expresan BCMA de mono cynomolgus, se secuenciaron y se volvieron a formatear secuencias únicas en fragmento Fab para caracterización adicional. La caracterización
15 bioquímica incluyó la evaluación de las afinidades de unión y la evaluación funcional se realizó mediante ensayos de bloqueo de BCMA/APRIL y BCMA/BAFF humanas.

Afinidades de unión Fab para BCMA

20 Quince clones Fab mostraron afinidades de unión a BCMA humano con una constante de disociación de equilibrio (K_D) por debajo de 2 μ M según se determinó mediante SPR. Los números de identificación de secuencia de la cadena pesada y las afinidades de unión de los
25 clones mencionados se informan en la Tabla 5. El clon anti-BCMA-PP02-D3 (sec. con núm. de ident.: 78), en

adelante denominado también anti-BCMA-D3, mostró afinidades a BCMA humano de 15 nM y a BCMA de mono cynomolgus de 40 nM. El clon anti-BCMA-PP02-E6 (sec. con núm. de ident.: 79), denominado en la presente 5 descripción también anti-BCMA-E6, mostró afinidades a BCMA humano de 18 nM y a BCMA de mono cynomolgus de 52 nM.

Nombre del clon	Cadena pesada del clon sec. con núm. de ident.	K _D de BCMA humano (nM)	K _D de BCMA de mono cynomolgus (nM)
FAB de anti-BCMA-UCP01-A8	Sec. con núm. de ident.: 68	235	NB
FAB de anti-BCMA-UCP01-A10	Sec. con núm. de ident.: 69	214	>2000
FAB de anti-BCMA-UCP01-C2	Sec. con núm. de ident.: 70	336	NB
FAB de anti-BCMA-UCP01-E8	Sec. con núm. de ident.: 71	1745	NB
FAB de anti-BCMA-UCP01-E9	Sec. con núm. de ident.: 72	10	236
FAB de anti-BCMA-UCP01-F9	Sec. con núm. de ident.: 73	617	NB
FAB de anti-BCMA-PP02-A3	Sec. con núm. de ident.: 74	318	>2000
FAB de anti-BCMA-PP02-B4	Sec. con núm. de ident.: 75	648	58
FAB de anti-BCMA-PP02-C2	Sec. con núm. de ident.: 76	915	NB
FAB de anti-BCMA-PP02-C4	Sec. con núm. de ident.: 77	608	114
FAB de anti-BCMA-PP02-D3	Sec. con núm. de ident.: 78	15	40
FAB de anti-BCMA-PP02-E6	Sec. con núm. de ident.: 79	18	52
FAB de anti-BCMA-PP02-F1	Sec. con núm. de ident.: 80	145	598
FAB de anti-BCMA-PP03-C4	Sec. con núm. de ident.: 81	549	109
FAB de anti-BCMA-PP03-E4	Sec. con núm. de ident.: 82	582	696

Tabla 5: Descripción general de los Fab de anti-BCMA desarrollados y su afinidad relativa con las proteínas BCMA recombinantes humanas y de mono cynomolgus según la evaluación mediante SPR. La tabla muestra los números de identificación de la secuencia de la cadena pesada de los clones, la afinidad (K_D) a la proteína BCMA humana recombinante y afinidad (K_D) a la proteína BCMA recombinante de mono cynomolgus para desarrollar Fabs anti-BCMA. NB = sin unión medible.

10

Ensayo de bloqueo de APRIL y BAFF

Se probaron fragmentos Fab para bloquear la interacción entre BCMA humano y APRIL humano o entre BCMA humano y BAFF humano usando SPR. Fragmentos Fab de anti-BCMA-D3 y anti-BCMA-E6 probados para bloquear la interacción entre BCMA humano y APRIL humano, así como entre BCMA humano y BAFF humano. Un aumento en la concentración de Fab en soluciones premezcladas de proteína BCMA-Fc recombinante y Fab de anti-BCMA-D3 o en soluciones premezcladas de proteína BCMA-Fc recombinante y Fab de anti-BCMA-E6 resultó en una disminución en la respuesta de unión (en RU, eje Y) de BCMA-Fc a la proteína APRIL recombinante inmovilizada o a la proteína BAFF recombinante inmovilizada. Se observó un bloqueo completo de la interacción BCMA humano/APRIL humano, así como un bloqueo completo de la interacción BCMA

humano/BAFF humano cuando se usó una proporción molar excesiva de anti-BCMA-D3/BCMA humano o una proporción molar excesiva de anti-BCMA-E6 Fab/BCMA humano. El bloqueo de la interacción entre la proteína BCMA humana recombinante y la proteína APRIL humana recombinante y el bloqueo de la interacción entre la proteína BCMA humana recombinante y la proteína BAFF humana recombinante tras la unión de los clones Fab de anti-BCMA-D3 y anti-BCMA-E6 a la proteína BCMA humana se ilustra en la Figura 6.

10

Ejemplo 6: Optimización de anti-BCMA-D3 y anti-BCMA-E6

Materiales y métodos

15 Generación y selección de genotecas

Se generaron cinco genotecas de maduración de afinidad para anti-BCMA-D3 (sec. con núm. de ident.: 78) y anti-BCMA-E6 (sec. con núm. de ident.: 79) al introducir diversidad en la cadena pesada de las CDR. CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 se aleatorizaron usando oligonucleótidos de codón NNK degenerados (en donde N es cualquiera de los cuatro desoxirribonucleótidos y K es G o T) en los residuos Kabat 27-35, 50-58, 95-101 menos 2, respectivamente. Cada colección se generó mediante el uso de una agrupación de oligonucleótidos superpuestos que contienen 5 codones degenerados consecutivos. CDR-H1 y

CDR-H2 también se diversificaron usando oligonucleótidos trómeros en las posiciones Kabat 27-35 y 50-58 respectivamente. Las genotecas se prepararon como se describe en el Ejemplo 2.

5 La selecci3n de expresi3n de fagos se realiz3 como se describe en el Ejemplo 1 con las siguientes modificaciones. Las genotecas se incubaron con perlas previamente cubiertas con 20 nM, 2 nM y 0,2 nM de prote3na BCMA humana recombinante biotinilada (Acrobiosystems, cat. n3m.: BCA-H82E4) para la ronda 1, ronda 2 y ronda 3, respectivamente. Despu3s de 1 h de incubaci3n, se a3adi3 1 μ M de prote3na BCMA humana recombinante no biotinilada (Acrobiosystems, cat. n3m.: BCA-H522y) durante 3 h a temperatura ambiente durante las rondas 2 y 3.

15

Análisis de afinidad mediante SPR

El análisis de SPR se us3 para confirmar la actividad de uni3n espec3fica de los nuevos clones scFv y clasificar los clones positivos de acuerdo con su perfil de uni3n. Las mediciones se realizaron como se describe en el Ejemplo 5 con las siguientes modificaciones. Prote3na BCMA humana recombinante (Acrobiosystems, cat. n3m.: BCA-H522y) se diluy3 hasta una concentraci3n final de 200 nM en regulador de acetato pH 4.5 (Cytiva Life Sciences, cat. n3m.: BR100350) y posteriormente se inmoviliz3 en una ruta de flujo 2 de los ocho canales a

aproximadamente 700-1000 RU en un CHIP sensor CM5 de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530) con el uso de un kit de acoplamiento de amina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100050). Los extractos
5 periplásmicos filtrados se inyectaron directamente en el chip sensor de BCMA humano acoplado covalentemente en las rutas de flujo 1 y 2 (ruta de flujo 1 se usó como referencia) durante 3 minutos. La disociación en regulador HBS-EP+ se monitoreó durante 3 minutos. Los
10 clones de scFv que muestran los mejores perfiles de unión se reformatearon en fragmentos Fab como se describen en el Ejemplo 5.

Afinidades de unión de Fab a la proteína BCMA recombinante

15 Se usó resonancia de plasmones superficiales (SPR) para medir las afinidades de unión de los fragmentos Fab para BCMA humano y de mono cynomolgus. Las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore 8K+ (Cytiva Life Sciences) usando el software de control Biacore 8K+ a
20 25 °C y se analizaron con el software de evaluación Biacore Insight (v3.0). Las mediciones de afinidad de los Fabs optimizados anti-BCMA-D3 con las proteínas BCMA humanas y de mono cynomolgus se realizaron en el chip sensor Serie S CM5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.:
25 BR100530) previamente recubierto con anticuerpo anti-IgG humano (Fc) usando un kit de captura de anticuerpos

humanos (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 29234600). Alrededor de 120 RU de proteína de fusión Fc BCMA humana recombinante (Acrobiosystems, cat. núm.: BC7-H5254) o alrededor de 145 RU de proteína de fusión BCMA Fc de mono
5 cynomolgus recombinante (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-C5253) se capturó en la ruta de flujo 2 del chip sensor recubierto con anticuerpo anti-IgG humano (Fc). Los Fab se inyectaron en un solo ciclo cinética a diferentes concentraciones que varían de 0,16 a 10 nM, en regulador
10 HBS-EP+ (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100669) a una velocidad de flujo de 30 μ l/min durante 3 min en la ruta de flujo 1 y 2 (ruta de flujo 1 se usa como referencia). Se controló la disociación durante 10 minutos. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró con 60 μ l de 3 M de
15 $MgCl_2$. Las mediciones de afinidad de los Fabs optimizados anti-BCMA-E6 con las proteínas BCMA humanas y de mono cynomolgus se realizaron en un chip CAPture de biotina Serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28920234). Alrededor de 20 RU de proteína BCMA humana recombinante
20 biotinilada (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-H82E4) o alrededor de 55 RU de proteína de fusión BCMA Fc de mono cynomolgus recombinante biotinilada (Acrobiosystems, cat. núm.: BCA-C82F4) se capturó en la ruta de flujo 2 de un chip sensor de la serie CAP. Los Fab se inyectaron en un
25 solo ciclo cinética a diferentes concentraciones que varían de 0,2 a 50 nM, en regulador HBS-EP+ (Cytiva Life

Sciences, cat. núm.: BR100669) a una velocidad de flujo de 30 μ l/min durante 3 min en la ruta de flujo 1 y 2 (trayecto de flujo 1 se usa como referencia). La disociación se monitoreó durante 10 min. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró con 60 μ l de solución de regeneración proporcionada con el kit de captura de biotina Serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28920234). Los datos experimentales se procesaron mediante el modelo de ajuste cinético de Langmuir 1:1. Las mediciones incluyeron muestras de concentración cero para referencia. Se usaron Chi2 y valores residuales para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y los modelos de unión individuales.

15 Detección de fragmentos Fab de anti-BCMA para su unión a células que expresan BCMA

La detección de anticuerpos anti-BCMA producidos como fragmentos Fab se realizó mediante estudios de unión en NCI-H929 silvestre y usando células BCMA KO NCI-H929 para medir la unión no específica.

En resumen, las células se recolectaron, contaron, y colocaron en placas a 1×10^5 células/pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (TPP, cat. núm. 92097). La placa se centrifugó a 350 g durante 3 min a 4 °C y las células se resuspendieron en 100 μ l de regulador FACS frío que contenía diluciones seriadas de

anticuerpos Fab de anti-BCMA a partir de 800 nM y diluidos 3 veces. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces con regulador FACS frío a 350 g durante 3 minutos y se resuspendieron en 50 μ l de anticuerpo secundario Fab PE anti-IgG humana policlonal (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: MA1-10377, 1/200) diluido en regulador FACS. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 100 μ l de regulador FACS que contenía tinción de células muertas SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: S34860). Las muestras se adquirieron en un instrumento CytoFlex (Beckman Coulter). Las células se clasificaron en función del tamaño FSC vs SSC y se excluyeron los desechos y los dobletes. Finalmente, se seleccionaron las células negativas para la tinción de viabilidad y se analizaron las células vivas para determinar la intensidad de fluorescencia media geométrica (geomean) de PE usando el software FlowJo. La intensidad de fluorescencia geomean relativa (RFI) se calculó restando la fluorescencia del control de isotipo (un Fab irrelevante) a la fluorescencia del anti-BCMA. Finalmente, los valores de intensidad de fluorescencia geomean relativa se graficaron usando el software Prism (GraphPad). Valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) se determinaron usando el ajuste de la curva de unión de un sitio en datos no transformados

(Prism). Los valores de K_D máximos de unión (RFI máximo) se resumen en la Tabla 6.

Resultados y conclusiones

5 La maduración por afinidad del clon anti-BCMA-D3 (sec. con núm. de ident.: 78 de cadena pesada) y del clon anti-BCMA-E6 (cadena pesada, sec. con núm. de ident.:79) implicó la diversificación de CDR-H1 (posiciones Kabat 27-35), CDR-H2 (posiciones Kabat 50-58)
10 y CDR-H3 (posiciones Kabat 95-101 menos 2) en cinco genotecas individuales. Se aislaron clones ScFv que tienen una constante de disociación más lenta que su clon parental respectivo (anti-BCMA-D3 o anti-BCMA-E6) según lo medido mediante SPR. Los clones ScFv se volvieron a
15 formatear y se expresaron como fragmentos Fab y afinidades con respecto a proteína de BCMA humana recombinante y a proteína de BCMA de mono cynomolgus recombinante se midieron mediante SPR. Un clon, anti-BCMA-D3-MP04-E11 (cadena pesada sec. con núm. de ident.:
20 93), también denominado en la presente descripción anti-BCMA-D3-E11, tuvo las afinidades más altas de los clones anti-BCMA-D3 optimizados para BCMA humano y de mono cynomolgus, con K_D medida a 0,01 nM para ambas proteínas y fue seleccionado para la generación de anticuerpos
25 CD3/BCMA/CD38 descritos en la presente descripción. Tres clones, concretamente el clon anti-BCMA-E6-PP02-B1

(cadena pesada sec. con núm. de ident.: 101), también denominado en la presente descripción anti-BCMA-E6-B1, el clon anti-BCMA-E6-PP02-E6 (cadena pesada sec. con núm. de ident.: 105), también denominado en la presente descripción anti-BCMA-E6-E6 y el clon anti-BCMA-E6-PP02-G6 (cadena pesada sec. con núm. de ident.: 108), también denominado en la presente descripción anti-BCMA-E6-G6, mostraron un aumento variable de la afinidad por el BCMA humano y de cynomolgus en comparación con el clon anti-BCMA-E6 parental y también se seleccionaron para la generación de anticuerpos CD3/BCMA/CD38 descritos en la presente descripción. Los valores de KD para anti-BCMA-E6-B1, anti-BCMA-E6-E6 y anti-BCMA-E6-G6 se midieron en 0,182 nM, 0,169 nM y 0,330 nM, respectivamente, para la proteína BCMA humana, y en 0,510 nM, 0,615 nM y 2,26 nM, respectivamente, para la proteína BCMA de mono cynomolgus. Los números de identificación de la secuencia de la cadena pesada, la afinidad de unión de los clones anti-BCMA-D3-optimizados y anti-BCMA-E6-optimizados desarrollados a las proteínas BCMA humanas y de mono cynomolgus y la afinidad de unión a las células H929 se informan en la Tabla 6. La Figura 7 muestra que todos los fragmentos Fab mostraron unión a las células NCI-H929 que expresan BCMA como se muestra en la Tabla 6. Se seleccionaron algunos clones, anti-BCMA-D3-MP04-E11, anti-BCMA-E6-PP02-B1, anti-BCMA-E6-PP02-E6 y anti-BCMA-

E6-PP02-G6, en función de sus fuertes propiedades de unión (K_D y máxima unión) con una mejora significativa en comparación con sus respectivos clones parentales. La especificidad también se confirmó por la falta de unión a la línea celular BCMA KO NCI-H929.

Genoteca de aleatorización de CDR	Nombre del clon	Cadena pesada del clon sec. con núm. de ident.	K_D de SPR de BCMA humano (nM)	K_D de SPR de BCMA de mono cynomolgus (nM)	K_D sobre NCI-H929 (nM)	Unión máxima en NCI-H929 (RFI)
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP03-G7 FAB	Sec. con núm. de ident.: 83	0,41	0,31	29,49	21530
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-A2 FAB	Sec. con núm. de ident.: 84	0,03	0,01	7,68	21478
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-B11a FAB	Sec. con núm. de ident.: 85	0,14	0,24	6,03	23663
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-B11b FAB	Sec. con núm. de ident.: 86	0,52	0,79	14,12	23316
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-B11c FAB	Sec. con núm. de ident.: 87	0,16	0,34	3,9	22905
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-B11d FAB	Sec. con núm. de ident.: 88	5,43	4,85	NT	NT
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-C2 FAB	Sec. con núm. de ident.: 89	0,03	0,02	6,49	24557
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-C8a FAB	Sec. con núm. de ident.: 90	0,09	0,17	3,65	26528
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-C8b FAB	Sec. con núm. de ident.: 91	0,03	0,11	7,39	28295
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-D4 FAB	Sec. con núm. de ident.: 92	0,02	0,01	8,84	25299
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-E11 FAB	Sec. con núm. de ident.: 93	0,01	0,01	13,45	31842
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-F3 FAB	Sec. con núm. de ident.: 94	0,64	3,03	7,12	19546
CDR-H2	Anti-BCMA-D3-MP04-G7 FAB	Sec. con núm. de	0,08	0,14	5,82	27035

		ident.: 95				
CDR-H3	Anti-BCMA-D3-MP05-A9 FAB	Sec. con núm. de ident.: 96	2,3	6,54	NT	NT
CDR-H3	Anti-BCMA-D3-MP05-C1a FAB	Sec. con núm. de ident.: 97	1,03	1,03	NT	NT
CDR-H3	Anti-BCMA-D3-MP05-C1b FAB	Sec. con núm. de ident.: 98	2,22	5,86	NT	NT
CDR-H3	Anti-BCMA-D3-MP05-F4 FAB	Sec. con núm. de ident.: 99	0,78	2,83	11,85	29941
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-A3 FAB	sec. con núm. de ident.: 100	0,33	0,915	6,37	40163
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-B1 FAB	sec. con núm. de ident.: 101	0,182	0,51	3,72	34715
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-B4 FAB	sec. con núm. de ident.: 102	0,086	0,857	5,49	43536
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-C7 FAB	sec. con núm. de ident.: 103	0,3	1,19	6,83	38616
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-D2 FAB	Sec. con núm. de ident.: 104	0,342	0,97	6,58	36313
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-E6 FAB	Sec. con núm. de ident.: 105	0,169	0,615	5,13	43245
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-F7 FAB	Sec. con núm. de ident.: 106	0,22	0,964	5,53	44707
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-G2 FAB	Sec. con núm. de ident.: 107	0,176	0,728	5,22	40502
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-G6 FAB	Sec. con núm. de ident.: 108	0,33	2,26	5,78	46477
CDR-H2	Anti-BCMA-E6-PP02-G7 FAB	Sec. con núm. de ident.: 109	0,061	0,237	4,86	39367

Tabla 6: Descripción general de los Fabs anti-BCMA-D3 y anti-BCMA-E6 optimizados desarrollados y su afinidad relativa a BCMA humano recombinante y al BCMA de mono

5 cynomolgus recombinante por SPR, así como su afinidad de unión relativa a las células NCI-H929. La Tabla 6 muestra

los números de identificación de secuencia de cadena
pesada de los clones (sec. con núm. de ident.), la
genoteca de aleatorización de CDR de la que derivan los
clones, la afinidad de unión (K_D) para desarrollar Fabs
5 anti-BCMA-D3 y anti-BCMA-E6 optimizados para la proteína
BCMA humana recombinante y para la proteína de mono
cynomolgus recombinante mediante SPR, así como afinidad
de unión (K_D) y valores máximos de unión (RFI)
determinados a partir de experimentos de citometría de
10 flujo en la línea celular NCI-H929. Los valores máximos
de unión y de K_D en la línea celular NCI-H929 son
valores promedio derivados de dos experimentos
independientes. NB = sin unión medible. NT = no probado.

15 Ejemplo 7: Generación de anticuerpos anti-CD38

Materiales y métodos

Antígenos diana recombinantes

20 Se obtuvieron los ADNc para CD38 humano y de
mono cynomolgus por medio de Source Biosciences (Erwin-
Negelin-Hauss, Alemania, cat. núm. núm.: IRAU37D11,
4309086), sus regiones extracelulares (núm. de acceso de
UniProt: P28907 residuos 43-300 y núm. de acceso de
25 Uniprot: Q5VAN0, los residuos 43-301 (el residuo 44 se
eliminó), respectivamente) se amplificaron y clonaron en

un vector de expresión interno derivado de pCDNA3.1 (Invitrogen AG). Este vector de expresión abarca una secuencia de Kozak y un codón de inicio seguido del péptido líder de la cadena ligera IgGK murina en el extremo 5' y una etiqueta 6-His en el extremo 3' de su sitio de clonación múltiple. La región extracelular soluble de CD38 humano (residuos 43 a 300, sec. con núm. de ident.: 607) y CD38 de mono cynomolgus (residuos 43-301, sec. con núm. de ident.: 608) fusionada a una etiqueta 6-His se expresó como sigue. Brevemente, un volumen de medio RPMI 1640 (PAA Laboratories) que contiene células HEK, 0,1 % de ácido plurónico (Invitrogen AG), vector de expresión y polietilenimina (JetPEI®, Polyplus-transfection, Illkirch, Francia) se incubó en un matraz de agitación a 37 °C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. Se añadió un volumen del medio Ex-Cell 293 complementado con 6 mM de glutamina a la mezcla después de 4 h y se continuó la incubación durante un total de 5 días. La producción posterior, el sobrenadante clarificado se obtuvo por centrifugación y se filtró mediante el uso de filtros 0,2 µm, el pH se ajustó a 7,4 (4 °C) con el uso de Tris 1 M pH 8.7. Se añadieron perlas de células de Ni-Sepharose (GE Healthcare) al sobrenadante clarificado y se incubaron durante la noche agitándolas a 4 °C. La solución se cargó en una Econo-columna (Bio-Rad Laboratories) para su purificación por flujo de gravedad. Las perlas se lavaron

posteriormente con IX PBS, pH 7.4 (1 o 2X 10 CV) y IX PBS, pH 7.4 complementado con 20 mM de imidazol (10 CV). La proteína, según el lote, se eluyó con IX PBS, pH 7.4 suplementado con 500 mM de imidazol o se eluyó mediante el
5 incremento gradual de la concentración en imidazol (40 mM, 80 mM y 250 mM de imidazol). Las fracciones de interés se agruparon y dializaron dos veces contra 1 x PBS, pH 7.4 a 4 °C. La proteína se concentró y se esterilizó por filtración con filtros de 0,22 µm. La calidad de la
10 proteína se evaluó mediante SDS-PAGE, SE-HPLC, medición de endotoxinas y ELISA. Brevemente, SE-HPLC se realizó mediante el uso de una columna de Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWxl (cat. núm.: 08541, Tosoh Bioscience) a temperatura ambiente con regulador de fosfato sódico 0,1
15 M, cloruro sódico 0,15 M, pH 6.8 como eluyente a una velocidad de flujo de 1 ml/min, en un sistema Waters Alliance 2695 HPLC con un detector Waters 2998 PDA (Waters), monitorizando a 214 nm y 280 nm. Se usó el sistema Multi-Cartridge Endosafe-MCS de Charles River que
20 usa un ensayo basado en lisado de amebocitos de Limulus (LAL) para confirmar un nivel de endotoxina bacteriano inferior a 0,5 EU/mg.

Estas proteínas se denominan en la presente descripción CD38-C-His humana y CD38-C-His de mono
25 cynomolgus y se describen como la sec. con núm. de

ident.: 607 y la sec. con núm. de ident.: 608, respectivamente.

Expresión y purificación de Fab Daratumumab

5 Para la expresión de Fab de daratumumab (sec. con núm. de ident.: 609 y sec. con núm. de ident.: 566), se cotransfectaron cantidades iguales de vectores de cadena pesada y cadena ligera en células HEK293-EBNA adaptadas a la suspensión (ATCC, cat. núm. CRL-10852) mediante el uso de PEI. Típicamente, las células se prepararon 25 a 8 millones de células por ml en rpmi complementado con 0,1 % de Pluronic F-68. A continuación, las células se transfectaron con una mezcla de DNA-PEI. Cuatro horas después de la transfección, el cultivo celular se diluyó 1:1 en EX-CELL® 293 complementado con rojo de fenol y L-glutamina a 4 mm y se incubó durante 5 días con agitación orbital a 37 °C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. Los sobrenadantes de cultivo libre de células que contenían las proteínas recombinantes se prepararon mediante centrifugación seguida de filtración, y se usaron para purificación adicional. El Fab se purificó usando proteína A (RepliGen CaptivA PrimAB, cat. núm.: CA-PRI). Se añadió resina de afinidad a los sobrenadantes de cultivo filtrados y se incubó en 4 °C con una mezcla suave. Al día siguiente, las perlas de resina se recogieron en columnas Poly-Prep (Laboratorios Bio-Rad),

se lavaron con PBS y las proteínas recombinantes se eluyeron con un regulador ácido (normalmente glicina 0,1 M pH 3.5). Después de que la neutralización con 1/10 de volumen de pH de Tris-HCl 8, las preparaciones se
5 intercambiaron con regulador en PBS.

Expresión transitoria del CD38 de longitud completa de humanos y monos cynomolgus en la línea celular CHO-S

Las secuencias humanas optimizadas por codones
10 de CD38 humano de longitud completa (secuencia UniProt ID P28907; residuos 1-300; sec. con núm. de ident.: 617), de CD38 de mono cynomolgus de longitud completa (número de acceso: Q5VAN0; residuos 1-301; sec. con núm. de ident.: 618) se clonaron en un plásmido pcDNA™3.1 modificado
15 (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: V79020). La transfección y la expresión de proteínas se realizaron en células CHO-S adaptadas a la suspensión (cGMP depositado, Invitrogen, cat. núm.: A1136401) como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas CD38 humanas y del mono
20 cynomolgus tal como se describen en la presente descripción tienen la sec. con núm. de ident.: 617 y la sec. con núm. de ident.: 618, respectivamente.

Selección de genoteca

25 La selección se realizó como se describe en el Ejemplo 5 con las siguientes modificaciones. La primera

estrategia de selección consistió en tres rondas de selección mediante el uso de la proteína CD38 humana recombinante biotinilada (Acrobiosystems, cat. núm.: CD8-H82E7). La segunda estrategia de selección consistió en dos
5 rondas de selección mediante la proteína CD38 humana recombinante biotinilada seguida de dos rondas mediante el uso de células CHO que expresan de manera transitoria la proteína CD38 humana (sec. con núm. de ident.: 617) o la proteína CD38 de mono cynomolgus (sec. con núm. de ident.:
10 618).

Análisis de scFv mediante SPR

Se usó análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para confirmar la actividad de unión
15 específica de los clones de scFv. Las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore 2000 (Cytiva Life Sciences) mediante el uso del software de control Biacore 2000 v3.2 a temperatura ambiente y se analizó con el software de evaluación Biacore T200 (v3.1). La proteína
20 CD38 humana recombinante disponible comercialmente (Acrobiosystems, cat. núm.: CD8-H5224) y proteína CD38 de mono cynomolgus recombinante (R&D Systems, cat. núm.: 9834-AC-050), o dominio extracelular CD38 humana recombinante (ECD)-C-his (sec. con núm. de ident.: 607) y proteínas
25 CD38-ECD-C-his de cynomolgus recombinantes (sec. con núm. de ident.: 608) producidas internamente se diluyeron

individualmente a una concentración final de 200 nM en regulador de acetato pH 4.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100350) y, posteriormente, se inmovilizó en la ruta de flujo 2 y 3, respectivamente, a un nivel de aproximadamente una unidad de resonancia 1500 (abreviado RU) en Chips Sensores CM5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100012) con el uso de un kit de acoplamiento de amina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100050). El trayecto de flujo 4 se inmovilizó de manera similar con la proteína CD38 de ratón recombinante disponible comercialmente (Creative Biomart, cat. núm.: CD 38-3112M) o con un antígeno irrelevante. HBS-EP (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100188) se usó como regulador de funcionamiento. Los extractos periplásmicos filtrados se inyectaron directamente en CD38-his humana acoplada covalentemente y al Sensor Chip CM5 CD38-his de mono cynomolgus. Las muestras se inyectaron en las vías de flujo 1, 2, 3 y 4 (la trayectoria de flujo 1 se usó como referencia) a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 3 min, seguido de un tiempo de disociación de 5 min en un regulador en funcionamiento. Después de cada evento de unión, la superficie se regeneró con una solución de 10 mM de glicina pH 1.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100354) inyectado por 1 min a 30 µl/min. Cada medición incluyó muestras de concentración cero, así como extractos

periplásmicos scFv irrelevantes para referencia y especificidad, respectivamente.

Análisis de scFv mediante citometría de flujo

5 La unión de los clones scFv a las células CHO que expresan transitoriamente la proteína CD38 humana (sec. con núm. de ident.: 617) se evaluó mediante citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 1.

10 Afinidades de unión de Fab para CD38

 Los fragmentos Fab de IgG1 humana se expresaron y purificaron como se describe en el Ejemplo 5. Se usó resonancia de plasmones superficiales (SPR) para medir las afinidades de unión de los fragmentos Fab para CD38 humano
15 y de mono cynomolgus. Las afinidades se midieron en un instrumento Biacore T200 (Cytiva Life Sciences) a 25 °C y se analizaron con el software de evaluación Biacore T200 (v3.1). Las mediciones a CD38 humano se realizaron en Chips Sensores SA de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.:
20 BR100531) o en chips de captura de biotina de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28920234) con el uso de CD38 humano biotinilado recombinante comercialmente disponible (Acrobiosystems, cat. núm.: CD8-H82E7). Las mediciones en CD38 de mono cynomolgus se realizaron en
25 Chips Sensores CM5 de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530) inmovilizado previamente con

anticuerpo antihistidina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28995056) mediante el uso de la proteína CD38-ECD-C-his de mono cynomolgus recombinante producida internamente (sec. con núm. de ident.: 617).

5 Las afinidades con respecto a CD38 humano y de mono cynomolgus se evaluaron inmovilizando CD38 y usando fragmentos Fab como analito. La proteína CD38 humana recombinante biotinilada se inmovilizó a alrededor de 160 RU en la ruta de flujo 2 de un Chip Sensor SA de la serie S
10 o a alrededor de 100 RU en la ruta de flujo 2 de un Chip Biotin CAPture de la serie S y la proteína CD38-his de mono cynomolgus recombinante se inmovilizó a alrededor de 50-100 RU en la vía de flujo 2 de un Chip Sensor CM5 de la serie S previamente recubierto previamente con anticuerpo
15 antihistidina. Los fragmentos Fab se inyectaron en un solo ciclo cinética a diferentes concentraciones que varían de 7,8 a 2000 nM, en regulador HBS-EP+ (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100669) a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 3 min en la ruta de flujo 1 y 2 (ruta de flujo 1 se
20 usa como referencia). La disociación se monitorizó durante 5 min. Después de cada ciclo, el Sensor Chip SA de la Serie S recubierto con la superficie de proteína CD38 humana recombinante biotinilada se regeneró con 60 µl de Glicina 10 mm pH 1.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100354)
25 mientras que el Chip Biotin CAPture de la Serie S y el Sensor Chip CM5 de la Serie S recubiertos con superficies

de anticuerpos antihistidina se regeneraron usando la solución de regeneración suministrada con el kit Biotin CAPture (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28920234) y kit de captura His (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28995056) respectivamente. Los datos experimentales se procesaron mediante el modelo de ajuste cinético de Langmuir 1:1. Las mediciones incluyeron muestras de concentración cero para referencia. Se usaron χ^2 , U- y valores residuales para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y los modelos de unión individuales

Unión de epítomos

Se evaluó la agrupamiento de epítomos de fragmentos Fab en CD38 humano mediante el uso de interferometría de biocapa (BLI). Las mediciones se realizaron en un instrumento OctetRED96e (Sartorius) y se analizaron mediante el uso del software de análisis de datos HT, versión 11.1 (Octet, Sartorius). Proteína CD38-avi-his humana biotinilada (Acrobiosystems, cat. núm.: CD8-H82E7) se cargó a 1 $\mu\text{g/ml}$ en regulador cinético durante 5 minutos (Sartorius, cat. núm.: 18-1105) en un Biosensor SA de estreptavidina (Sartorius, cat. núm.: 15-5019) previamente sumergido en regulador cinético durante 10 min. El biosensor de estreptavidina recubierto con antígeno CD38 humano biotinilado se sumergió en una solución de 200 nM de anticuerpo Fab 1 (Abl) durante 10

min para alcanzar la saturación de la superficie recubierta de CD38, seguido de una inmersión sucesiva en una solución mixta de 200 nM de Abl y 200 nM de anticuerpo Fab 2 (Ab2) durante 5 min (fase de 5 competición). Se realizó el mismo procedimiento experimental usando 400 nM de Abl solo en la fase de competencia como control para la saturación de la superficie. Todas las etapas se realizaron a 25 °C y 1000 RPM de agitación. Los biosensores de estreptavidina 10 frescas se recubrieron con CD38 humano biotinilado antes de cada ciclo.

Resultados y conclusiones

Los clones ScFv que muestran unión específica a 15 las proteínas recombinantes CD38 humanas y proteínas recombinantes de mono cynomolgus mediante SPR, así como la unión específica a las células CHO de CD38 humana se secuenciaron y se volvieron a formatear secuencias únicas que muestran los mejores perfiles de unión en SPR en 20 fragmento Fab para la medición de afinidad de unión.

Afinidades de unión de Fab a CD38

Veintisiete clones de Fab mostraron afinidades de unión a las proteínas CD38 humanas y de mono cynomolgus 25 recombinantes con una constante de disociación de equilibrio (K_D) por debajo de 2 μ M según se determinó por

SPR. El clon anti-CD38-UCP03-B3 (cadena pesada sec. con
 núm. de ident.: 110), también denominado en la presente
 descripción anti-CD38-B3, mostró afinidades por el CD38
 humano y el CD38 de mono cynomolgus de 115 nM y 170 nM
 5 respectivamente. El clon anti-CD38-UCP01-E2 (cadena pesada
 sec. con núm. de ident.: 111), también denominado en la
 presente descripción anti-CD38-E2, mostró afinidades por
 el CD38 humano y el CD38 de mono cynomolgus de 110 nM y 89
 nM respectivamente. Los números de identificación de
 10 secuencia de la cadena pesada y las afinidades de unión de
 los clones anti-CD38 desarrollados se informan en la Tabla
 7.

Nombre del clon	Cadena pesada del clon sec. con núm. de ident.	K _D de CD38 humano (nM)	K _D de CD38 de mono cynomolgus (nM)
Fab anti-CD38-UCP01-B1	Sec. con núm. de ident.: 619	193	102
Fab anti-CD38-UCP01-D1	Sec. con núm. de ident.: 620	666	NB
Fab anti-CD38-UCP01-F1	Sec. con núm. de ident.: 621	429	393
Fab anti-CD38-UCP01-G1	Sec. con núm. de ident.: 622	1124	283
Fab anti-CD38-UCP01-H1	Sec. con núm. de ident.: 623	437	352
Fab anti-CD38-UCP01-C2	Sec. con núm. de ident.: 624	85,3	53,5
Anti-CD38-UCP01-E2 FAB	Sec. con núm. de ident.: 111	110	89
Fab anti-CD38-UCP02-A7	Sec. con núm. de ident.: 625	71,14	Unión baja
Fab anti-CD38-UCP02-B1	Sec. con núm. de ident.: 626	595	Unión baja
Fab anti-CD38-UCP02-B7	Sec. con núm. de ident.: 627	1709	NT
Fab anti-CD38-UCP02-C3	Sec. con núm. de ident.: 628	305,1	187,7

Fab anti-CD38-UCP02-D1	Sec. con núm. de ident.: 629	132,9	78
Fab anti-CD38-UCP02-D5	Sec. con núm. de ident.: 630	192	33,5
Fab anti-CD38-UCP02-E5	Sec. con núm. de ident.: 631	0,03	Unión baja
Fab anti-CD38-UCP02-F2	Sec. con núm. de ident.: 632	14,16	13,96
Fab anti-CD38-UCP02-F5	Sec. con núm. de ident.: 633	71,08	55,22
Fab anti-CD38-UCP02-F6	Sec. con núm. de ident.: 634	389,2	Unión baja
Fab anti-CD38-UCP02-H1	Sec. con núm. de ident.: 635	153,9	2,7
Anti-CD38-UCP03-B3 FAB	Sec. con núm. de ident.: 110	115	170
Fab anti-CD38-UCP03-C3	Sec. con núm. de ident.: 636	117	465
Fab anti-CD38-UCP03-H5	Sec. con núm. de ident.: 637	141,6	111
Fab anti-CD38-UCP03-B6	Sec. con núm. de ident.: 638	225	829
Fab anti-CD38-UCP03-E3	Sec. con núm. de ident.: 639	300	195
Fab anti-CD38-UCP03-A6	Sec. con núm. de ident.: 640	410	525
Fab anti-CD38-UCP03-C2	Sec. con núm. de ident.: 641	1388	628
Fab anti-CD38-UCP03-H2	Sec. con núm. de ident.: 642	1850	672
Fab anti-CD38-UCP03-H3	Sec. con núm. de ident.: 643	810	178

Tabla 7: Afinidad relativa de los Fabs anti-CD38

desarrollados con el CD38 humano y del mono cynomolgus. La
tabla muestra los números de identificación de secuencia de
5 cadena pesada de los clones (sec. con núm. de ident.), la
afinidad (KD) a la proteína CD38 humana recombinante y la
afinidad (K_D) a la proteína CD38 de mono cynomolgus
recombinante para desarrollar Fabs anti-CD38.

10 Unión de epítomos

Para evaluar la competencia de los clones anti-CD38 en CD38, se realizó un ensayo de agrupamiento de epítomos usando fragmentos Fab de anti-CD38, fragmento Fab de daratumumab producido internamente (sec. con núm. de ident.: 566 y sec. con núm. de ident.: 609) y proteína CD38 humana recombinante usando interferometría de biocapa de octetos (BLI). Un aumento en la respuesta de unión (en nm, eje Y) al sumergir el biosensor recubierto de CD38 previamente saturado con el anticuerpo Abl en una solución premezclada de anticuerpos Abl/Ab2 indica que los anticuerpos Abl y Ab2 no compiten por la unión a CD38 y, por lo tanto, no reconocen epítomos superpuestos en CD38. La Figura 8 muestra que los clones anti-CD38-E2 y anti-CD38-B3 no compiten por unirse a CD38 y, por lo tanto, no reconocen epítomos superpuestos en CD38. Además, la Figura 8 muestra que los anti-CD38-E2 y anti-CD38-B3 no compiten con Fab de daratumumab para unirse con CD38 y, por lo tanto, no reconocen epítomos superpuestos en CD38.

20

Ejemplo 8: Optimización de anti-CD38-E2 y anti-CD38-B3

Material y métodos

25 Antígenos diana recombinantes

La proteína CD38-ECD-C-his humana recombinante (sec. con núm. de ident.: 607), en la presente descripción denominada, además, proteína CD38 humana recombinante, y proteína CD38-ECD-C-his de mono cynomolgus recombinante (sec. con núm. de ident.: 608), en la presente descripción denominada, además, proteína CD38 de mono cynomolgus recombinante, se produjeron internamente como se describe en el Ejemplo 7.

10 Generación y selección de genotecas

Se generaron cinco genotecas de maduración de afinidad para los clones anti-CD38-B3 (sec. con núm. de ident.: 110) y anti-CD38-E2 (sec. con núm. de ident.: 111) al introducir diversidad en la cadena pesada de las CDR.

15 CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 se aleatorizaron usando oligonucleótidos de codón NNK degenerados (en donde N es cualquiera de los cuatro desoxirribonucleótidos y K es G o T) en los residuos Kabat 27-35, 50-58, 95-101 menos 2, respectivamente. Cada colección se generó mediante el uso

20 de una agrupación de oligonucleótidos superpuestos que contienen 5 codones degenerados consecutivos. CDR-H1 y CDR-H2 también se diversificaron usando oligonucleótidos trímeros en las posiciones Kabat 27-35 y 50-58 respectivamente. Las genotecas se prepararon como se

25 describe en el Ejemplo 2.

La selección de expresión de fagos se realizó como se describe en el Ejemplo 5 con las siguientes modificaciones. El fago deseleccionado se incubó con 50 nM, 5 nM y 0,5 nM de proteína CD38 humana recombinante biotinilada (Acrobiosystems, cat. núm.: CD8-H82E7) para la 5 ronda 1, ronda 2 y ronda 3, respectivamente. Después de 1 h de incubación, se añadió 1 μ m de proteína CD38 humana recombinante no biotinilada producida internamente (sec. con núm. de ident.: 607) durante 3 h a TA durante las 10 rondas 2 y 3.

Análisis de afinidad mediante SPR

El análisis de SPR se usó para confirmar la actividad de unión específica de los nuevos clones scFv y 15 clasificar los clones positivos de acuerdo con su perfil de unión. Las mediciones se realizaron como se describe en el Ejemplo 7 con las siguientes modificaciones. Las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore T200 (Cytiva Life Sciences) y se analizaron con el software de 20 evaluación Biacore T200 (v3.1) o en un instrumento Biacore 8K+ (Cytiva Life Sciences) usando el software de control Biacore 8K+ y se analizaron con el software de evaluación Biacore Insight (v3.0). La proteína CD38 humana recombinante disponible comercialmente (Acrobiosystems, 25 cat. núm.: CD8-H224) o la proteína CD38 humana recombinante producida internamente (sec. con núm. de

ident.: 607) se diluyó a una concentración final de 200 nM en regulador de acetato pH 4.5 (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100350) y posteriormente se inmovilizó en una ruta de flujo 2 a niveles de aproximadamente 1300 RU o 250 RU en Chips sensores CM5 de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530) con el uso de un kit de acoplamiento de amina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100050). Los extractos periplásmicos filtrados se inyectaron directamente en el chips sensores de CD38 CM5 humana acoplado covalentemente en las rutas de flujo 1 y 2 (ruta de flujo 1 se usó como referencia) durante 3 minutos. La disociación en regulador HBS-EP+ se monitoreó durante 3 a 10 minutos. Los clones de scFv que muestran los mejores perfiles de unión se reformatearon en fragmentos Fab como se describen en el Ejemplo 5.

Afinidades de unión de Fab a CD38

Las afinidades del Fab con el CD38 humano y de mono cynomolgus se midieron mediante SPR como se describe en el Ejemplo 5 con las siguientes modificaciones. Las mediciones se realizaron a 25 °C en un instrumento Biacore T200 (Cytiva Life Sciences) y se analizaron con el software de evaluación Biacore T200 (v3.1) o en un instrumento Biacore 8K+ (Cytiva Life Sciences) usando el software de control Biacore 8K+ y se analizaron con el software de evaluación Biacore Insight (v3.0). Las afinidades del Fab

con el CD38 humano se realizaron en chips CAPture de biotina Serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28920234) inmovilizado con CD38 humano biotinilado recombinante (Acrobiosystems, cat. núm.: CD8-H82E7) en la ruta de flujo 2 a niveles entre 50 y 70 RU. Los Fabs se inyectaron en una cinética de ciclo único durante 3 minutos con concentraciones que oscilaron entre 1,95 nM y 500 nM. Las mediciones en CD38 de mono cynomolgus se realizaron en Chips Sensores CM5 de la serie S (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: BR100530) inmovilizado previamente con anticuerpo antihistidina (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28995056). La proteína recombinante CD38-ECD-C-his de mono cynomolgus producida internamente (sec. con núm. de ident.: 608) se inmovilizó en la ruta de flujo 2 a niveles de alrededor de 50 RU. Los Fab se inyectaron en una cinética de ciclo único durante 3 minutos con concentraciones que variaban de 1,48 nM a 120 nM o de 1,95 nM a 500 nM. La disociación se monitoreó durante 5 a 10 minutos.

20 Resultados y conclusiones

La maduración por afinidad del clon anti-CD38-B3 (sec. con núm. de ident.: 110 de cadena pesada) y del clon anti-CD38-E2 (cadena pesada, sec. con núm. de ident.:111) implicó la diversificación de CDR-H1 (posiciones Kabat 27-35), CDR-H2 (posiciones Kabat 50-58) y CDR-H3 (posiciones Kabat 95-101 menos 2) en cinco genotecas individuales. Se

aislaron clones ScFv que tienen una constante de disociación más lenta que su clon parental respectivo (anti-CD38-E2 o anti-CD38-B3) según lo medido mediante SPR. Los clones ScFv se volvieron a formatear y se expresaron como fragmentos Fab y afinidades con respecto a proteína de CD38 humana recombinante y a proteína de CD38 de mono cynomolgus recombinante se midieron mediante SPR. Un clon, anti-CD38-B3-PP11-C11 (cadena pesada sec. con núm. de ident.: 113), también denominado en la presente descripción anti-CD38-B3-C11, mostró un aumento en la afinidad por el CD38 humano y de cynomolgus en comparación con el clon anti-CD38-B3 parental, con K_D medida a 5,4 nM y 25 nM respectivamente, y se seleccionó para la generación de anticuerpos CD3/BCMA/CD38 descritos en la presente descripción. Un clon, anti-CD38-E2-UCP02-A5 (cadena pesada sec. con núm. de ident.: 122), también denominado en la presente descripción anti-CD38-E2-A5, mostró mayores afinidades por el CD38 humano y de mono cynomolgus en comparación con el clon anti-CD38-E2 parental, con K_D medida a 23,6 nM y 4,4 nM respectivamente, y también se seleccionó para la generación de anticuerpos CD3/BCMA/CD38 descritos en la presente descripción.

Los números de identificación de la secuencia de cadena pesada y las afinidades de unión a las proteínas CD38 recombinantes humanas y de mono cynomolgus de los clones mencionados se informan en la Tabla 8.

Genoteca	Nombre del clon	Cadena pesada del clon sec. con núm. de ident.	K _D de CD38 humano (nM), Fab como analito	K _D de CD38 de mono cynomolgus (nM), Fab como analito
CDR-H1	Anti-CD38-B3-PP11-A2 FAB	Sec. con núm. de ident.: 112	38,4	62,5
CDR-H3	Anti-CD38-B3-PP11-C11 FAB	Sec. con núm. de ident.: 113	5,4	25
CDR-H1	FAB anti-CD38-B3-PP11-D1a	Sec. con núm. de ident.: 114	10	9,6
CDR-H1	FAB anti-CD38-B3-PP11-D1b	Sec. con núm. de ident.: 115	5,8	14,6
CDR-H3	FAB anti-CD38-B3-PP11-D11a	Sec. con núm. de ident.: 116	8,2	17,3
CDR-H1	Anti-CD38-B3-PP11-E1 FAB	Sec. con núm. de ident.: 117	10,5	26,3
CDR-H3	Anti-CD38-B3-PP11-E11 FAB	Sec. con núm. de ident.: 118	2	8,9
CDR-H1	FAB anti-CD38-B3-PP11-H1a	Sec. con núm. de ident.: 119	15,3	17,9
CDR-H3	Anti-CD38-B3-PP11-H10 FAB	Sec. con núm. de ident.: 120	6,2	22,7
CDR-H1	Anti-CD38-E2-UCP01-A10 FAB	Sec. con núm. de ident.: 121	9,4	8,6
CDR-H2	Anti-CD38-E2-UCP02-A5 FAB	Sec. con núm. de ident.: 122	23,6	4,4
CDR-H2	Anti-CD38-E2-UCP02-D6 FAB	Sec. con núm. de ident.: 123	4,9	1,1
CDR-H2	Anti-CD38-E2-UCP02-E7 FAB	Sec. con núm. de ident.: 124	2,2	1,8
CDR-H2	Anti-CD38-E2-UCP02-F3 FAB	Sec. con núm. de ident.: 125	3,5	2,4
CDR-H2	Anti-CD38-E2-UCP02-F8 FAB	Sec. con núm. de ident.: 126	17,6	24,5
CDR-H2	Anti-CD38-E2-UCP02-G8 FAB	Sec. con núm. de ident.: 127	5,2	4,2

Tabla 8: Descripción general de los Fabs anti-CD38-B3 y anti-CD38-E2 optimizados desarrollados y su afinidad

5 relativa con el CD38 humano y del mono cynomolgus medida por resonancia de plasmón superficial. La tabla muestra los números de identificación de secuencia de cadena pesada de los clones (sec. con núm. de ident.), afinidad (K_D) a la

proteína CD38 humana recombinante y afinidad (K_D) a la proteína CD38 de mono cynomolgus recombinante para desarrollar Fabs anti-CD38-B3 y anti-CD38-E2 optimizados.

5 Ejemplo 9: Diseño de anticuerpos CD3/BCMA/CD38

Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 de acuerdo con la invención comprenden un primer sitio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo sitio de unión a BCMA humano y un tercer sitio de unión a antígeno que se une a CD38 humano. Los anticuerpos triespecíficos CD3/BCMA/CD38 se pueden diseñar usando dos arquitecturas novedosas. En el primero, la configuración BO ("BTB Outer": El brazo de unión de CDR en la posición externa del brazo de BEAT BTB), el brazo de unión de CD3 y BCMA se encuentran en el mismo brazo del anticuerpo de BEAT, por lo que el brazo de unión de CD3 está en la posición distal de Fc y el brazo de BCMA de alta afinidad está en la posición proximal de Fc, y los dos se fusionan a través de un enlazador flexible (sec. con núm. de ident.: 605). El aglutinante BCMA de alta afinidad en la posición proximal de Fc en la configuración BO puede impulsar la formación de una sinapsis inmunológica corta que une la célula efectora con la célula tumoral. El brazo de unión de CD38 está en el brazo A del BEAT (Figura 9A). En la configuración C, el brazo de unión de CD3 está en el primer brazo del anticuerpo biespecífico, y los dos brazos de unión del

antígeno asociado al tumor (TAA) están en el mismo brazo del BEAT, el brazo B. Ambos están unidos a través de un enlazador flexible (sec. con núm. de ident.: 604), mediante el cual un Fab dirigido a CD38 se fusiona al extremo C de un brazo de unión a BCMA, con el objetivo de unirse a las células tumorales con alta avidéz (Figura 9B).

En la presente descripción proporcionamos anticuerpos heterodiméricos que incluyen los seleccionados del grupo que comprende

CD3/BCMA/CD38-43, CD3/BCMA/CD38-86,
CD3/BCMA/CD38-92, CD3/BCMA/CD38-93,
CD3/BCMA/CD38-103, CD3/BCMA/CD38-114,
CD3/BCMA/CD38-115, CD3/BCMA/CD38-116,
CD3/BCMA/CD38-117, CD3/BCMA/CD38-118,
CD3/BCMA/CD38-119.

En particular:

CD3/BCMA/CD38-43 es una combinación de la sec. con núm. de ident.:522, sec. con núm. de ident.:523 y sec. con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-86 es una combinación de la sec. con núm. de ident.NO:530, sec. con núm. de ident.:531 y sec. con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-92 es una combinación de la sec. con núm. de ident.:532, sec. con núm. de ident.:533 y sec. con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-93 es una combinación de la sec.
con núm. de ident.:534, sec. con núm. de ident.:535 y
sec. con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-103 es una combinación de la sec.
5 con núm. de ident.:536, sec. con núm. de ident.:537 y sec.
con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-114 es una combinación de la sec.
con núm. de ident.:538, sec. con núm. de ident.:539 y sec.
con núm. de ident.:1

10 CD3/BCMA/CD38-115 es una combinación de la sec.
con núm. de ident.:540, sec. con núm. de ident.:541 y sec.
con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-116 es una combinación de la sec.
con núm. de ident.:542, sec. con núm. de ident.:543 y sec.
15 con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-117 es una combinación de la sec.
con núm. de ident.:544, sec. con núm. de ident.:545 y sec.
con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-118 es una combinación de la sec.
20 con núm. de ident.:546, sec. con núm. de ident.:547 y sec.
con núm. de ident.:1

CD3/BCMA/CD38-119 es una combinación de la sec.
con núm. de ident.:548, sec. con núm. de ident.:549 y sec.
con núm. de ident.:1

25 Los anticuerpos triespecíficos son un grupo de
derivados de anticuerpos diseñados que reconocen tres

antígenos diana diferentes. La tecnología de anticuerpos triespecíficos TREAT se basa en la plataforma BEAT®. La plataforma BEAT® se basa en la sustitución de la interfaz proteína-proteína del par de dominios CH3 de la región Fc del anticuerpo por la interfaz proteína-proteína de la región constante α - β del receptor de células T (TCR) (Skegro et al., J Biol Chem, 2017, 292(23):9745-9759; Stutz et al., J Biol Chem, 2020, 295(28):9392-9408). La interfaz BEAT resultante impulsa la formación y purificación preferencial de anticuerpos biespecíficos o triespecíficos heterodímeros (bsAbs o TriAbs) sobre los contaminantes homodímeros. Además, los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 usan un brazo de unión Fab CD38 como unidad Fab, un brazo de unión Fab BCMA y un brazo de unión Fab CD3 que usan una cadena ligera común para evitar el apareamiento incorrecto de la cadena ligera, un desafío común asociado con las plataformas bsAb y más aún con las TriAbs. También se realizó ingeniería adicional para permitir un proceso de purificación más fácil y rápido, se mantuvo la conformación natural en la estructura del anticuerpo, la estabilidad y la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), maximizando la vida media sérica de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 (Skegro et al., J Biol Chem, 2017, 292(23):9745-9759; Stutz et al., J Biol Chem, 2020, 295(28):9392-9408).

Ejemplo 10: Combinaciones de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos CD3/BCMA/CD38

Materiales y métodos

5 Para permitir el análisis de los efectos de la variación del formato, las afinidades y el epítipo CD38 sobre la farmacología in vitro, la combinación descrita en la Tabla 9 se expresó y purificó como se describe en el Ejemplo 3.

10

Resultados y conclusiones

En la Tabla 9 a continuación se enumeran las combinaciones de cadenas usadas para la expresión de anticuerpos triespecíficos CD3/BCMA/CD38.

15

CD3/BCMA/CD38-	Cadena 1	Cadena 2	Cadena 3
043	Sec. con núm. de ident.: 522	Sec. con núm. de ident.: 523	Sec. con núm. de ident.: 1
086	Sec. con núm. de ident.: 530	Sec. con núm. de ident.: 531	Sec. con núm. de ident.: 1
092	Sec. con núm. de ident.: 532	Sec. con núm. de ident.: 533	Sec. con núm. de ident.: 1
093	Sec. con núm. de ident.: 534	Sec. con núm. de ident.: 535	Sec. con núm. de ident.: 1
103	Sec. con núm. de ident.: 536	Sec. con núm. de ident.: 537	Sec. con núm. de ident.: 1
114	Sec. con núm. de ident.: 538	Sec. con núm. de ident.: 539	Sec. con núm. de ident.: 1
115	Sec. con núm. de ident.: 540	Sec. con núm. de ident.: 541	Sec. con núm. de ident.: 1
116	Sec. con núm. de ident.: 542	Sec. con núm. de ident.: 543	Sec. con núm. de ident.: 1
117	Sec. con núm. de ident.: 544	Sec. con núm. de ident.: 545	Sec. con núm. de ident.: 1
118	Sec. con núm. de ident.: 546	Sec. con núm. de ident.: 547	Sec. con núm. de ident.: 1

119	Sec. con núm. de ident.: 548	Sec. con núm. de ident.: 549	Sec. con núm. de ident.: 1
-----	------------------------------	------------------------------	----------------------------

Tabla 9: Sec. con núm. de ident. de los anticuerpos

CD3/BCMA/CD38

5 Ejemplo 11: Expresión y caracterización de anticuerpos

CD3/BCMA/CD38 producidos en células CHO

Materiales y métodos

Para permitir el análisis de los efectos de la
10 variación del formato, las afinidades y el epítipo CD38
sobre la farmacología in vitro, las combinaciones
descritas en la Tabla 9 se expresaron y purificaron como
se describe en el Ejemplo 3.

15 Resultados y conclusiones

Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se produjeron con
éxito en células CHO-S y fueron altamente monodispersos con
porcentajes de pico principal que oscilaron entre 95,05 y
99,93 % mediante SE-HPLC posterior a la purificación de
20 acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 3.

Los detalles del formato, aglutinantes, títulos
y pureza final se dan en la Tabla 10.

CD3/BCMA/ CD38_	043	086	092	093	103	114	115	116	117	118	119
Formato	BO	C	C	C	C	C	C	C	BO	BO	BO

Aglutinante CD3	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6	C1-D6
Aglutinante CD38	E2	B3-C11	B3-C11	B3-C11	B3-C11	E2-A5	B3-C11	B3	E2-A5	B3-C11	B3
Aglutinante BCMA	D3-E11	D3-E11	E6-E6	E6-G6	E6-B1 N82aS	E6-G6 N82aS	E6-G6 N82aS	E6-G6 N82aS	E6-G6 N82aS	E6-G6 N82aS	E6-G6 N82aS
Rendimiento de purificación de proteína A (mg/L)	42	N/A	45	30,6	57,7	44,88	52,8	N/A	72,6	34,32	47,3
Pureza post-Proteína A (% de monómero por SE-HPLC)	92,42	90,37	95,57	95,05	94,77	92,96	93,84	N/A	85,75	94,94	94,53
Pureza final (% de monómero por SE-HPLC)	98,37	99,93	95,57	95,05	99,47	98,42	99,26	99,3	99,01	99,36	99,77

Tabla 10. Expresión y caracterización de anticuerpos

CD3/BCMA/CD38 en células CHO-S

5 Ejemplo 12: Expresión y caracterización de moléculas de control para la caracterización de CD3/BCMA/CD38 TREATS

Materiales y métodos

Las moléculas de control descritas a
10 continuación se produjeron de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 3.

Resultados y conclusiones

Además, se probaron moléculas de control de
15 acuerdo con las combinaciones de secuencias detalladas en la Tabla 11 que usaron un aglutinante irrelevante, denominado G6DU, en lugar del Fab de unión a CD3, en

lugar de los Fab de unión a BCMA y CD38 o en lugar de los tres Fab de unión (control de isotipo) como se detalla en la Tabla 12. Otros controles incluyeron anticuerpos biespecíficos dirigidos a BCMA y CD3 pero no a CD38 con dos aglutinantes BCMA diferentes usados en anticuerpos triespecíficos.

CD3/BCMA/CD38_	Cadena 1	Cadena 2	Cadena 3
082	Sec. con núm. de ident.: 526	Sec. con núm. de ident.: 527	Sec. con núm. de ident.: 1
085	Sec. con núm. de ident.: 528	Sec. con núm. de ident.: 529	Sec. con núm. de ident.: 1
120	Sec. con núm. de ident.: 550	Sec. con núm. de ident.: 551	Sec. con núm. de ident.: 1
121	Sec. con núm. de ident.: 552	Sec. con núm. de ident.: 553	Sec. con núm. de ident.: 1
122	Sec. con núm. de ident.: 554	Sec. con núm. de ident.: 555	Sec. con núm. de ident.: 1
044	Sec. con núm. de ident.: 524	Sec. con núm. de ident.: 525	Sec. con núm. de ident.: 1
123	Sec. con núm. de ident.: 556	Sec. con núm. de ident.: 557	Sec. con núm. de ident.: 1

Tabla 11: Sec. con núm. de ident. de anticuerpos control

10 CD3/BCMA/CD38

Los anticuerpos de control se diseñaron y produjeron con éxito en células CHO-S y fueron altamente monodispersos con porcentajes de pico principal que oscilaron entre el 96 y el 100 %, medidos mediante SE-
15 HPLC posterior a la purificación (Tabla 12).

CD3/BCMA/CD38-	082	085	120	121	122	044	123
Formato	C	N/A	C	BO	BO	BEAT	BEAT
Aglutinante CD3	C1-D6	G6DU	G6DU	G6DU	C1-D6	C1-D6	C1-D6

Aglutinante CD38	G6DU	G6DU	B3-C11	B3-C11	G6DU	Ninguno	Ninguno
Aglutinante BCMA	G6DU	G6DU	E6-G6-N82aS	E6-G6-N82aS	G6DU	D3-E11	E6-G6-N82aS
Rendimiento de purificación (mg/L)	31-38	N/A	16	19	15	19-101	16
Pureza final (% de monómero por SE-HPLC)	98-99	96-98	99	99	100	97-99	100

Tabla 12: Descripción y caracterización de moléculas de control usadas para caracterizar las moléculas CD3/BCMA/CD38.

5

Ejemplo 13: Detección de la potencia destructora de tumores de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 en presencia y ausencia de BCMA soluble y actividad fuera del tumor en la diana

10 Ejemplo 13 (a): Ensayo RDL con células tumorales KMS-12-BM que expresan niveles bajos de BCMA y CD38 y el efecto del BCMA soluble en la potencia de muerte

Materiales y métodos

15 Se probaron varios constructos de TREAT CD3/BCMA/CD38 descritos en el Ejemplo 10, que contienen los mismos aglutinantes dirigidos a CD3 y CD38 y diferentes aglutinantes madurados por afinidad E6 dirigidos a BCMA, E6-E6 (CD3/BCMA/CD38-092), E6-G6
20 (CD3/BCMA/CD38-093) y E6-B1 (CD3/BCMA/CD38-103) para determinar la eficacia y potencia de muerte de tumores de células KMS-12-BM usando citometría de flujo. Se sabe que

los niveles de BCMA soluble circulante en la sangre de pacientes con mieloma múltiple son significativamente más altos que los niveles de BCMA soluble circulante en la sangre de donantes sanos (promedio de 89,91 ng/ml y 5 8,04 ng/ml, respectivamente (Pillarisetti et al, 2020)). En circulación, el BCMA soluble podría unirse al aglutinante anti-BCMA del TREAT CD3/BCMA/CD38, presentando un riesgo potencial de hundimiento y disminuyendo la posibilidad de que la molécula se una a 10 las células tumorales, impactando así la potencia de muerte. Por lo tanto, se evaluó la actividad de muerte de estos TREAT en presencia de niveles elevados de BCMA soluble (150 ng/ml), superiores al promedio de los niveles observados en la sangre de pacientes con mieloma 15 múltiple.

83A10-TCBcv

La molécula comparadora 83A10-TCBcv (que comprende la sec. con núm. de ident.: 558, sec. con núm. de 20 ident.: 559, sec. con núm. de ident.: 560 y sec. con núm. de ident.: 561) se produjo y purificó como se detalla en el Ejemplo 3.

Ensayo RDL con células tumorales KMS-12-BM que expresan
25 niveles bajos de BCMA y CD38 y el efecto del BCMA soluble
en la potencia de muerte

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos obtenidas del Centro de Transfusión de La Chaux-de-Fonds/Berna (Suiza) mediante aislamiento en gradiente de densidad de Ficoll y se congelaron en medio de congelación de células CryoStor10 (Stemcell, núm. 07930). Las células se descongelaron en un medio RPMI completo precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante la noche a 2×10^6 células/ml. Veinte mil células diana (KMS-12-BM, DSMZ, ACC 551) marcadas con el colorante de proliferación celular eFluor 670 (ThermoFisher Scientific, 65-0840-85) se cocultivaron con cien mil PBMC marcadas con el colorante de proliferación celular eFluor 450 (ThermoFisher Scientific, 65-0842-85) alcanzando una relación efector-diana de 5:1. Se incubaron diluciones seriadas de candidatos CD3/BCMA/CD38 a partir de 20 nM y diluidos 10 veces, y anticuerpo de control (Control negativo (CD3/BCMA/CD38_085) (no mostrado)) en cocultivo durante 72 h, a 37 °C, 5 % de CO₂. Después del período de incubación, se evaluó la lectura del ensayo RDL midiendo la actividad citotóxica de las células T contra las células diana. La muerte de células tumorales se determinó midiendo el recuento absoluto de células diana vivas (células

eFluor670+) y se calculó como % de muerte diana = $[1 - (\text{recuentos absolutos de muestra})/(\text{recuentos absolutos en presencia de células diana solamente})] \times 100$. La muerte de células tumorales específicas se calculó como % de muerte específica = % de muerte de la diana (muestra) - % de muerte de la diana no específico (en ausencia de anticuerpos). La mitad de la concentración efectiva máxima o EC₅₀ se calculó a partir de los valores de mortalidad específicos usando la regresión no lineal de respuesta a la dosis sigmoidea. Se excluyeron algunos valores en función de la bondad del ajuste ($R^2 > 0,8$), sobre el porcentaje de muerte espontánea de células tumorales (ventana de ensayo), valores de EC₅₀ fuera de rango y porcentajes inadecuados de muerte (<20 % o >130 %).

Usando el mismo protocolo, se realizaron experimentos adicionales en presencia de BCMA soluble, suplementado a una concentración final de 150 ng/ml. En estos experimentos, la dosis inicial usada fue de 200 nM.

Las medias de EC₅₀ se informan en pM en la Tabla 13. Se realizaron un total de dos experimentos independientes con cada candidato para un total de tres donantes.

Resultados y conclusiones

La comparación entre TREAT CD3/BCMA/CD38 que contiene los mismos aglutinantes dirigidos a CD3 y CD38 y

diferentes aglutinantes madurados por afinidad E6 dirigidos a BCMA, E6-E6, E6-G6 y E6-B1 respectivamente mostró que CD3/BCMA/CD38-093 desencadenó la muerte más eficiente de KMS-12-BM, en presencia de 150 ng/ml de BCMA soluble, lo que sugiere que este candidato se ve menos afectado por el BCMA soluble en comparación con otros candidatos y mantuvo una fuerte potencia de muerte incluso en presencia de BCMA soluble. Por lo tanto, se seleccionó el aglutinante BCMA anti-BCMA E6-G6 presente en CD3/BCMA/CD38-093 para una mayor optimización de las moléculas CD3/BCMA/CD38.

Tratamiento	Tipo	CD3	BCMA	CD38	Media de EC ₅₀ (pM)	
					Sin sBCMA	sBCMA
CD3/BCMA/CD38-092	TREAT C	C1-D6	E6-E6	B3-C11	3,3	49,5
CD3/BCMA/CD38-093	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3-C11	4,1	28,4
CD3/BCMA/CD38-103*	TREAT C	C1-D6	E6-B1	B3-C11	4,0	47,5

Tabla 13: El candidato CD3/BCMA/CD38-093 desencadena la muerte más potente de células KMS-12-BM en presencia de BCMA soluble en el ensayo de lisis redirigida. La tabla muestra la media de EC₅₀ de muerte específica determinada a partir de experimentos de lisis redirigida en la línea celular KMS-12-BM incubadas con o sin BCMA soluble (150 ng/ml). Se analizaron un total de tres donantes de PBMC en dos experimentos independientes. *Cabe destacar que la mutación N82aS impide la unión a la proteína A.

Ejemplo 13 (b): RDL de células tumorales NCI-H929, MOLP-8 y KMS-12-BM que expresan diversos niveles de BCMA y CD38 y el efecto del BCMA soluble en la potencia de muerte

5 Materiales y métodos

Los anticuerpos adicionales descritos en el Ejemplo 10 (-043, -086, -114, -115, -116, -117, -118, -119) se probaron junto con los constructos CD3/BCMA/CD38 previamente seleccionados (-093) y los puntos de referencia (BEAT CD3/CD38, TNB-F2B BEAT Fc, 83A10-TCBcv). Se analizaron los CD3/BCMA/CD38 para determinar su potencia de muerte de tumores en ensayos RDL en líneas celulares de mieloma múltiple NCI-H929, MOLP-8 y KMS-12-BM (en ausencia o presencia de BCMA soluble) y para determinar la activación de células T fuera del tumor en un ensayo de PBMC de alta densidad usando citometría de flujo como lectura.

Los ensayos se realizaron siguiendo las mismas metodologías y materiales descritos anteriormente.

20

Resultados y conclusiones

Se probaron múltiples candidatos CD3/BCMA/CD38 para determinar su potencia de muerte en tres líneas celulares de mieloma múltiple, KMS-12-BM (caracterizadas como células de baja expresión de BCMA y CD38), MOLP-8 (caracterizadas como células de baja expresión de BCMA y

CD38 alta) y NCI-H929 (caracterizadas como células de expresión media de BCMA y CD38) en comparación con tres puntos de referencia: BEAT CD3/CD38, 83A10-TCBcv y TNB-F2B BEAT Fc. Todos los valores de EC_{50} de potencia de muerte se indican en la Tabla 14.

Todos los candidatos fueron capaces de provocar una fuerte muerte de líneas de células tumorales con EC_{50} que van desde 0,4 a 25,4 pM. Todos ellos indujeron la muerte de las tres líneas celulares que expresaban niveles variables de CD38 y BCMA. Las comparaciones entre moléculas con aglutinantes coincidentes, como CD3/BCMA/CD38-115 (C) y -118 (BO), por ejemplo, mostraron que el formato BO afecta positivamente la muerte de líneas celulares tumorales para todas las líneas celulares, demostrando un aumento de la potencia de muerte de 3 veces (-118 versus -115 en KMS-12-BM). La afinidad de los aglutinantes anti-CD38 afectó la potencia de muerte en todas las líneas celulares, como se observó para los candidatos -118 y -119, demostrando un aumento en la potencia de muerte de 8,3 veces (-118 versus -119 en KMS-12-BM).

La comparación entre las moléculas de formato C con diferentes brazos de unión de CD38, CD3/BCMA/CD38-093 y CD3/BCMA/CD38-114, mostró que el anti-CD38-B3-C11 aumentó la potencia de muerte de la molécula en todas las líneas celulares en comparación con el anti-CD38-E2-A5 (EC_{50} entre

5,3 y 9,1 veces menor). Esto también es cierto cuando estos aglutinantes están en formato B0, pero en menor medida, con una diferencia de 1,7 a 2,3 veces observada en EC_{50} entre CD3/BCMA/CD38-117 (E2-A5) y CD3/BCMA/CD38-118 (B3-C11). La
5 comparación entre CD3/BCMA/CD38-086 y CD3/BCMA/CD38-093 mostró que el candidato con el aglutinante anti-BCMA-E6-G6 fue menos afectado por el BCMA soluble en comparación con otro candidato y mantuvo una fuerte potencia de muerte incluso en presencia de BCMA soluble.

10 La mutación N82aS se introdujo en varios candidatos para evitar la unión a la proteína A, como el candidato CD3/BCMA/CD38-115. La comparación entre moléculas que comparten el mismo formato y aglutinantes mostró que la mutación N82aS no modificó la potencia de
15 muerte del candidato (-115 vs. -093).

Todos los candidatos CD3/BCMA/CD38 informados en la Tabla 14 indujeron una potente muerte redirigida de células T y demostraron una potencia de muerte superior, con valores de EC_{50} más bajos, en comparación con los puntos
20 de referencia TNB-F2B BEAT Fc (excepto -116 solo en células tumorales KMS-12-BM). Un grupo de candidatos mostró una mayor capacidad para inducir citotoxicidad mediada por células T, de manera consistente en todas las líneas celulares: CD3/BCMA/CD38-117, -118, -119 con formato B0 y
25 CD3/BCMA/CD38-115 con formato C. Un candidato, CD3/BCMA/CD38-118, desencadenó una muerte

significativamente más fuerte en comparación con el punto de referencia 83A10-TCBcv y BEAT CD3/CD38 en todas las líneas celulares.

Los candidatos CD3/BCMA/CD38-043, -93, -115, -
5 117, -118, -119 también mostraron una importante muerte antitumoral en presencia de 150 ng/ml de BCMA soluble. La potencia de muerte de CD3/BCMA/CD38-086 con el aglutinante anti-BCMA-D3-E11 se vio más afectada por la presencia de BCMA soluble en comparación con TREAT con el
10 aglutinante anti-BCMA-E6-G6 de mayor afinidad, CD3/BCMA/CD38 -093.

Tratamiento	Tipo	CD3	BCMA	CD38	NCI-H929		MOLP-8		KMS-12-BM			
									no soluble		sBCMA	
					Media de EC ₅₀ (pM)	DE de EC ₅₀ (pM)	Media de EC ₅₀ (pM)	DE de EC ₅₀ (pM)	Media de EC ₅₀ (pM)	DE de EC ₅₀ (pM)	Media de EC ₅₀ (pM)	DE de EC ₅₀ (pM)
BEAT CD3/CD38	BEAT 1.0	CD3	Ninguno	CD38	6,5	4,8	3,1	3,0	3,2	1,0	3,5	1,2
TNB-F2B BATE FC	Punto de referencia CD3xBC MA	CD3	BCMA	Ninguno	265,1	104,7	100,4	62,8	25,1	10,3	112,4	111,0
83A10-TCBcv	Punto de referencia CD3xBC MA	CD3	BCMA	Ninguno	3,4	1,5	29,0	9,7	3,1	1,1	48,0	40
CD3/BCMA/CD38-043	TREAT BO	C1-D6	D3-E11	E2	15,6	12,3	1,5	1,1	0,6	0,4	24,7	19,8
CD3/BCMA/CD38-086	TREAT C	C1-D6	D3-E11	B3-C11	16,6	15,8	3,0	2,2	2,2	1,2	45,2	35,4
CD3/BCMA/CD38-093	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3-C11	1,7	0,8	1,3	0,9	1,3	0,7	10,6	3,2
CD3/BCMA/CD38-114*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	E2-A5	9,0	4,1	11,8	7,0	8,5	5,7	46,1	17,3
CD3/BCMA/CD38-115*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3-C11	1,7	1,0	1,7	0,9	1,2	0,7	4,6	1,8
CD3/BCMA/CD38-116*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3	8,9	4,1	7,6	5,8	25,4	15,8	197,5	91,6
CD3/BCMA/CD38-117*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	E2-A5	2,0	1,3	1,3	0,5	0,9	0,6	3,3	1,5

CD3/BCMA/CD38-118*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	B3-C11	1,2	0,9	0,7	0,7	0,4	0,2	3,0	1,0
CD3/BCMA/CD38-119*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	B3	3,2	1,4	4,9	4,7	3,3	1,3	26,1	9,0

Tabla 14: Entre los candidatos CD3/BCMA/CD38 preseleccionados, -118 desencadena la muerte más potente de células KMS-12-BM en presencia de BCMA soluble en el ensayo de lisis redirigida. La tabla muestra la media +/- desviación estándar de EC₅₀ de muerte específica determinada a partir de experimentos de lisis redirigida en líneas celulares NCI-H929, MOLP-8 y KMS-12-BM incubadas (con o sin BCMA soluble (150 ng/ml) para la línea celular KMS-12-BM). Se analizaron un total de seis donantes de PBMC en tres experimentos independientes. *A tener en cuenta, la mutación N82aS (numeración de Kabat) en el VH que impide la unión a la proteína A.

En conjunto, estos datos sugieren que la muerte mediada por células T de los mejores candidatos, CD3/BCMA/CD38-115, -117, -118, -119, se ve potenciada por la doble unión a los dos antígenos diana. Además, el TREAT CD3/BCMA/CD38 con el brazo de unión a CD3 en posición externa mostró una muerte superior. En conclusión, la actividad citotóxica de los candidatos CD3/BCMA/CD38 fue superior en comparación con los puntos de referencia biespecíficos.

10

Ejemplo 13 (c): Actividad fuera del tumor en la diana

Materiales y métodos

Se espera que una baja actividad fuera del tumor in vitro esté asociada con un perfil de seguridad más favorable de los anticuerpos bioterapéuticos en la clínica. Con este fin, se evaluó la capacidad de los candidatos CD3/BCMA/CD38 TREAT para inducir la respuesta de las células T en ausencia de células tumorales en un ensayo de PBMC de alta densidad in vitro. Los linfocitos activados se identificaron basándose en la expresión de marcadores de activación CD25 o CD69 en poblaciones de células T vivas CD4 y CD8. Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos obtenidas de centros de transfusión de La Chaux-de-Fonds/Berna (Suiza) mediante

aislamiento en gradiente de densidad de Ficoll y se congelaron en medio de congelación de células CryoStor10 (Stemcell, núm. 07930). Las PBMC se descongelaron en medio RPMI completo precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se incubaron durante 48 h a 37 °C, 5 % de CO₂, a 10 x 10⁶ células/ml en una placa de 6 pocillos (TPP, 92006, 3 ml/pocillo). Después, se recolectaron PBMC y se sembraron en placas a 1 x 10⁵ células/pocillo en una placa de 96 pocillos en presencia de diluciones seriadas de candidatos CD3/BCMA/CD38, puntos de referencia (BEAT CD3/CD38, 83A10-TCBcv, TNB-F2B BEAT Fc) y controles (CD3/BCMA/CD38-085, fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich, L2646), anti-CD3 recubierto (ThermoFisher, 16-0037-85) y anti-CD28 soluble (BioXcell, BE0291)) a partir de 200 nM y diluidos 5 veces durante 48 horas adicionales a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de la incubación, las placas se centrifugaron (350 g, 5 min) y los sobrenadantes se congelaron para una mayor cuantificación de citocinas. Después, las células se transfirieron a una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se lavaron y se resuspendieron en 25 µl de un cóctel de anticuerpos para CD4-PE-eFluor610 humano (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: 61-0049-42), CD8-AlexaFluor700 (BD Pharmingen, cat.

núm.: 557945), CD25-PE y CD69-PE-Cy7 (ThermoFisher Scientific, cat. núms.: 12-0259-42 y 25-0699-42, respectivamente) diluidos 1/100 en regulador FACS y reactivo de bloqueo de FcR (1/250, Miltenyi Biotec, cat. 5 núm.: 130-059-901) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS que contenía tinción de células muertas SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: S34860) diluido 1/2000. Las 10 muestras se adquirieron en un instrumento CytoFlex (Beckman Coulter). Las células se clasificaron en función del tamaño FSC vs SSC y se excluyeron los desechos y los dobletes. Finalmente, se seleccionaron las células negativas para la tinción de viabilidad. La activación de 15 las células T se determinó evaluando el porcentaje de células CD25 o CD69 positivas activadas por células T CD4⁺ o CD8⁺. Se extrajeron los porcentajes de valores de células T activadas (CD69⁺ de células T CD4 o CD8, CD25⁺ de células T CD4 o CD8). A partir de estos datos se 20 determinaron dos parámetros: el umbral de activación y la activación máxima. El umbral de activación se define por la primera dosis que muestra una activación estadísticamente significativa (Regulación positiva de CD69⁺ o CD25⁺ en células T CD4⁺ o CD8⁺) en comparación con 25 el control negativo (CD3/BCMA/CD38_085) y la activación máxima es la media +/- desviación estándar del porcentaje

de células activadas (la activación más alta observada entre las dosis probadas). Ambos parámetros se obtuvieron usando el software JMP (SAS), el umbral de activación se determinó usando el modelo de mínimos cuadrados anidados
5 seguido de una comparación post-hoc de Dunnet en comparación con el control negativo (CD3/BCMA/CD38_085), el valor $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo. Los valores de activación máxima y umbral de activación se resumen en la Tabla 15 y la Tabla 16,
10 respectivamente. Se realizaron dos experimentos independientes con cada candidato para un total de cuatro donantes.

Resultados y conclusiones

15 Los resultados de la Tabla 15 muestran que los candidatos CD3/BCMA/CD38-117, -118 y -119 indujeron una activación mínima de las células T asociada con la actividad fuera del tumor en la diana con un aumento del 9,8-24,0 % del marcador CD25 en células T CD4⁺ y CD8⁺ y
20 aumento del 11,1-45,9 % del marcador CD69 en células T CD4⁺ y CD8⁺, mientras que los controles positivos como anti-CD3/anti-CD28 indujeron una mayor regulación positiva (61,1-77,6 % de regulación positiva de CD25 y 43,7-70,9 % de regulación positiva de CD69). Además, los candidatos
25 CD3/BCMA/CD38-117, -118 y -119, en ausencia de células tumorales, indujeron la activación de células T asociada

con la actividad fuera del tumor en la diana en menor medida en comparación con los candidatos -086, -114, -115 (umbral de activación de 8 o 200 nM, respectivamente para -117, -118 y -119 y 1,6 nM para -086, -114, -115). Además, todos los controles (-044, -082, -085, -120, -121, -122, -123) muestran una regulación positiva muy limitada de CD25 y CD69 en células t CD4⁺ y CD8⁺ en comparación con el control negativo. En conjunto, esto sugiere que el formato BO (-117, -118, -119) es menos propenso a inducir actividad fuera del tumor en la diana en comparación con el formato C (-086, -114, -115).

Tratamiento	Tipo	CD 3	BC MA	CD 38	CD25 ⁺ CD4 ⁺		CD25 ⁺ CD8 ⁺		CD69 ⁺ CD4 ⁺		CD69 ⁺ CD8 ⁺	
					Promedio	+/- DE	Promedio	+/- DE	Promedio	+/- DE	Promedio	+/- DE
Sin anticuerpo	N/A	N/A	N/A	N/A	4,05	1,24	0,65	0,46	1,21	1,31	0,90	0,38
Control negativo (CD3/BCMA/CD 38_085)	N/A	G6 DU	G6 DU	G6 DU	4,09	1,42	0,91	0,46	1,37	1,37	1,05	0,31
anti-CD3+ anti- CD28	N/A	N/A	N/A	N/A	77,59	13,93	61,11	10,15	70,94	11,87	43,72	10,14
PHA	N/A	N/A	N/A	N/A	46,26	4,97	29,49	10,07	55,60	10,06	28,00	8,33
83A10-TCBcv	Punto de referencia CD3xB CMA	CD 3	BC MA	Ninguno	22,47	9,22	21,46	15,06	39,70	12,45	23,49	6,51
CD3/BCMA/CD38-043	TREAT BO	C1-D6	D3-E11	E2	17,46	6,15	17,57	8,90	39,92	12,52	21,94	1,67
CD3/BCMA/CD38-044	BEAT	C1-D6	D3-E11	Ninguno	11,95	2,42	14,51	9,16	35,37	11,26	19,40	3,22
CD3/BCMA/CD38-082	TREAT C	C1-D6	G6 DU	G6 DU	4,17	1,46	1,79	1,42	2,02	1,16	3,23	0,98
CD3/BCMA/CD38-086	TREAT C	C1-D6	D3-E11	B3-C11	64,14	18,30	69,77	6,90	67,40	14,11	47,75	10,59
CD3/BCMA/CD38-114*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	E2-A5	69,34	10,14	74,14	9,27	69,72	13,00	53,86	9,73
CD3/BCMA/CD38-115*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3-C11	49,54	11,69	62,90	8,31	66,99	18,75	52,81	12,73
CD3/BCMA/CD38-116*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3	24,29	8,32	39,62	11,86	50,22	21,01	37,83	7,66
CD3/BCMA/CD38-117*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	E2-A5	22,87	5,32	24,03	10,72	45,91	14,60	24,28	5,56
CD3/BCMA/CD38-118*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	B3-C11	19,31	6,00	20,91	7,39	42,20	19,03	25,32	3,96
CD3/BCMA/CD38-119*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	B3	9,81	3,46	11,50	5,63	20,42	10,87	11,11	2,87
CD3/BCMA/CD38-120*	TREAT C	G6DU	E6-G6	B3-C11	4,36	1,55	1,06	0,80	1,23	0,84	0,91	0,40
CD3/BCMA/CD38-121*	TREAT BO	G6DU	E6-G6	B3-C11	4,47	2,13	0,78	0,56	2,89	3,78	1,22	1,12
CD3/BCMA/CD38-122	TREAT BO	C1-D6	G6 DU	G6 DU	4,24	1,76	0,83	0,20	2,20	2,30	1,58	0,79
CD3/BCMA/CD38-123*	BEAT	C1-D6	E6-G6	Ninguno	9,14	1,50	12,38	7,67	19,62	9,97	14,84	3,77

5 Tabla 15: Los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 inducen una activación mínima de las células T asociada con la actividad fuera del tumor en la diana en comparación con los controles positivos. La tabla muestra la media +/- desviación estándar de la activación máxima determinada a partir de experimentos de PBMC de alta densidad y medida por el porcentaje de regulación positiva de CD69 y CD25 en células T CD8 y CD4. Se analizaron un total de cuatro donantes de PBMC en dos experimentos independientes. *Cabe destacar que la mutación N82aS impide la unión a la proteína A.

Tratamiento (nM excepto controles positivos)	Tipo	CD3	BCMA	CD38	CD69 ⁺ de Células T CD4 ⁺	CD25 ⁺ de Células T CD4 ⁺	CD69 ⁺ de Células T CD8 ⁺	CD25 ⁺ de Células T CD8 ⁺
Anti-CD3+ anti-CD28 o PHA	N/A	N/A	N/A	N/A	<5	<5	<5	<5
83A10-TCBcv	Referencia CD3xBCMA	CD3	BCMA	Ninguno	40	200	40	40
CD3/BCMA/CD38-043	TREAT BO	C1-D6	D3-E11	E2	40	200	8	40
CD3/BCMA/CD38-086	TREAT C	C1-D6	D3-E11	B3-C11	1,6	8	1,6	1,6
CD3/BCMA/CD38-114*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	E2-A5	1,6	1,6	1,6	1,6
CD3/BCMA/CD38-115*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3-C11	1,6	1,6	1,6	1,6
CD3/BCMA/CD38-116*	TREAT C	C1-D6	E6-G6	B3	40	200	8	40
CD3/BCMA/CD38-117*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	E2-A5	8	40	8	8
CD3/BCMA/CD38-118*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	B3-C11	8	40	8	8
CD3/BCMA/CD38-119*	TREAT BO	C1-D6	E6-G6	B3	>200	>200	200	200

Tabla 16: Los candidatos CD3/BCMA/CD38-117, -118 y -119 inducen la activación de células T asociada con la actividad fuera del tumor en la diana en menor medida en comparación con los candidatos -086, -114 y -115. La tabla muestra el umbral de activación en nM (excepto anti-CD3+ anti-CD28 y PHA, dosis en ug/ml) determinado a partir de experimentos de PBMC de alta densidad y medido por el porcentaje de regulación positiva de CD69 y CD25 en células T CD8 y CD4. *Cabe destacar que la mutación N82aS en el VH impide la unión a la proteína A.

Ejemplo 14: Perfiles de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de anticuerpos CD3/BCMA/CD38

15

Materiales y métodos

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las estabilidades térmicas de los anticuerpos se compararon usando mediciones calorimétricas. Las mediciones calorimétricas se llevaron a cabo en un calorímetro MicroCal PEAQ-DSC (Malvern Instruments, Reino Unido). El volumen de células fue de 0,128 ml, la velocidad de calentamiento fue de 1 °C/min y la presión en exceso se mantuvo a 64 psi. Todos los fragmentos de proteína se usaron a una concentración de 1-2 mg/ml en PBS (pH 7.4). La capacidad de calor molar de cada proteína se estimó por comparación con muestras duplicadas que contenían regulador idéntico a partir del cual se había omitido la proteína. Las capacidades de calor molar parcial y las curvas de fusión se analizaron usando procedimientos estándar. Los termogramas se corrigieron a los valores iniciales y la concentración normalizada antes de ser analizada adicionalmente usando un modelo Non-Two State.

Se conocen los perfiles de fusión esperados para las subclases de IgG humana (Garber E y Demarest SJ (2007) *Biochem Biophys Res Commun*, 355(3): 751-7) y se ha demostrado que todos los perfiles contienen tres transiciones de desdoblamiento correspondientes al desdoblamiento independiente de los dominios CH2, CH3 y Fab. De las cuatro subclases de IgG humanas, IGHG1 tiene el dominio CH3 más estable (~85 °C); Mientras que otros

dominios CH3 de subclases son menos estables, aunque no se sabe que ninguno se funda por debajo de los 70 °C. De manera similar, se sabe que todas las subclases tienen una temperatura de fusión de ~70 °C para el dominio CH2.

5

Resultados y conclusiones

La estabilidad térmica de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38-115, CD3/BCMA/CD38-117, CD3/BCMA/CD38-118, CD3/BCMA/CD38-119 se evaluó mediante calorimetría 10 diferencial de barrido. CD3/BCMA/CD38-115 mostró una transición térmica (Tm) para el dominio BEAT Fc a 70,09 °C (superposición de Tm de los dominios CH2 y CH3, en línea con los datos publicados informados en Skegro et al., J Biol Chem, 2017, 292(23):9745-9759) y a 83,22 °C 15 para los Fabs. De manera similar, CD3/BCMA/CD38-117 mostró una transición térmica (Tm) para el dominio BEAT Fc a 69,89 °C y a 82,78 °C para los Fabs. CD3/BCMA/CD38-118 mostró una transición térmica (Tm) para el dominio BEAT Fc a 69,99 °C y a 83,1 °C para los Fabs. 20 CD3/BCMA/CD38-119 mostró una transición térmica (Tm) para el dominio BEAT Fc a 70,05 °C y a 82,81 °C y 86,6 °C para los Fabs como se resume en la Tabla 17 y los termogramas correspondientes se muestran en la Figura 10A-D.

Nombre	Área total (kcal/mol)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
TREAT CD3/BCMA/CD38-115	1660	70,09	83,22	N/A

TREAT CD3/BCMA/CD38-117	1550	69,89	82,78	N/A
TREAT CD3/BCMA/CD38-118	1660	69,99	83,1	N/A
TREAT CD3/BCMA/CD38-119	1530	70,05	82,81	86,6

Tabla 17: Temperaturas de transición medidas por DSC para
TREAT CD3/BCMA/CD38 seleccionado

5 Ejemplo 15: Unión a dianas de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38

Materiales y métodos

Mediciones de afinidad mediante SPR

10 Las afinidades de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 por sus tres dianas (CD3, CD38 y BCMA) se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento Biacore 8K+ (Cytiva Life Sciences) a 25 °C y se analizaron con el software de evaluación Biacore

15 Insight (v3). Las mediciones se realizaron en un chip sensor CAP usando el kit Biotin CAPture (Cytiva Life Sciences, cat. núm.: 28920234). El kit Biotin CAPture contiene los reactivos y el chip sensor que permiten la unión reversible de moléculas biotiniladas para analizar

20 las interacciones con el sistema Biacore. Los ligandos biotinilados, CD3, CD38 o BCMA, se capturan en la superficie del sensor a través del reactivo Biotin CAPture, una estreptavidina modificada que se puede unir de forma reversible a la superficie del chip

(<https://d3.cytivalifesciences.com/prod/IFU/28924234.pdf>)

. Después de medir la interacción de CD3/BCMA/CD38 con el ligando inmovilizado, la superficie se puede regenerar para iniciar un nuevo ciclo de inmovilización del ligando y análisis de la interacción.

Afinidad de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 por el CD3 ϵ δ humano

Para medir la afinidad de unión de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 a CD3 ϵ δ con CD3 ϵ δ como ligando, la proteína recombinante humana CD3E y CD3D, marcada con His-Avi, biotinilada (CD3 ϵ δ , 10-16 RU) se inmovilizó en un chip CAPture Biotin Serie S después de añadir 2500-5000 RU de reactivo CAPture. El CD3 ϵ δ se inmovilizó a un caudal de 10 μ L/min y a una concentración de 33,1 nM durante 24 s. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se inyectaron en series de concentraciones a un caudal de 30 μ L/min y en regulador HBS-EP+ a 25 °C. El tiempo de asociación fue de 3 minutos y el tiempo de disociación fue de 5 minutos.

Afinidad de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 por el CD38 humano

Para medir la afinidad de unión de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 a CD38 con CD38 como ligando, la proteína CD38 humano biotinilada, Avitag™, His Tag (CD38, 16-55 RU) se inmovilizó en un chip CAPture de

biotina Serie S después de añadir 2500-5000 RU de reactivo CAPture. El CD38 se inmovilizó a una velocidad de flujo de 10 µL/min y a una concentración de 32 nM durante 50 s. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se inyectaron en series de concentraciones a una velocidad de flujo de 30 µl/min y en regulador HBS-EP+ a 25 °C. El tiempo de asociación fue de 3 minutos y el tiempo de disociación fue de 10 minutos.

10 Afinidad de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 por el BCMA humano

Para medir la afinidad de unión de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 a BCMA con BCMA como ligando, la proteína humana biotinilada BCMA/TNFRSF17, His, Avitag™ DMF Filed (BCMA, 6-8 RU) se inmovilizó en un chip CAPture de biotina Serie S después de añadir 2500-5000 RU de reactivo CAPture. El BCMA se inmovilizó a una velocidad de flujo de 10 µL/min y a una concentración de 52 nM durante 12 s. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se inyectaron en series de concentraciones a una velocidad de flujo de 30 µl/min y en regulador HBS-EP+ a 25 °C. El tiempo de asociación fue de 4 minutos y el tiempo de disociación fue de 10 minutos.

25 Resultados y conclusiones

La afinidad de unión de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 por las proteínas humanas CD3 $\epsilon\delta$, BCMA y CD38 se determinó mediante resonancia plasmónica de superficie. Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 se diseñaron con brazos de unión Fab a CD3 ϵ (Fab C1-D6), BCMA (Fab E6-G6 N82aS) y CD38 (Fab B3-C11, B3 o E2-A5). Las afinidades de unión se midieron en CD3, CD38 o BCMA humanos inmovilizados en diversas concentraciones de CD3/BCMA/CD38 en un instrumento Biacore 8K+ a 25 °C. El anticuerpo biespecífico CD3xBCMA 83A10-TCBcv (Seckinger et al, 2017) se incluyó como molécula de referencia en todos los experimentos. Los valores de K_D de anticuerpos CD3/BCMA/CD38 para la interacción 1:1 con CD3 humano, BCMA humano y CD38 humano se midieron como se indica en la Tabla 18.

Unión a la diana (SPR, nM)	CD3/BCMA/CD38-115	CD3/BCMA/CD38-117	CD3/BCMA/CD38-118	CD3/BCMA/CD38-119	83A10-TCBcv
CD3 $\epsilon\delta$ humano (Figura 11)	15,8 $\pm$ 1,9	30,0 $\pm$ 2,3	41,4 $\pm$ 2,8	44,8 $\pm$ 4,1	12,1 $\pm$ 1,3 (8,0 $\pm$ 0,9 usando un ajuste cinético 1:1)
CD38 humano (Figura 12)	1,5 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,2	36,8 $\pm$ 1,9	No aplicable
BCMA humano (Figura 13)	1,10 $\pm$ 0,06	1,71 $\pm$ 0,03	1,87 $\pm$ 0,11	1,92 $\pm$ 0,40	0,074 $\pm$ 0,010

Tabla 18: Unión de la diana de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 y del punto de referencia 83A10-TCBcv. La tabla muestra las afinidades de unión (K_D) medidas usando SPR para anticuerpos CD3/BCMA/CD38 y el anticuerpo

de referencia 83A10-TCBcv para proteína CD3 $\epsilon\delta$ humana
recombinante, BCMA humano recombinante y proteína CD38
humano recombinante, respectivamente. Los datos
representan el valor promedio de $K_D \pm$ desviación
5 estándar de al menos dos mediciones.

La Figura 11 (para CD3 $\epsilon\delta$), la Figura 12 (para
CD38) y la Figura 13 (para BCMA) muestran sensogramas de
unión representativos de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 a
sus dianas. Estas mediciones confirmaron que el
10 CD3/BCMA/CD38 se unía a los tres antígenos diana, con
mayores afinidades hacia los antígenos asociados al tumor
BCMA y CD38, y menores afinidades hacia el CD3.

Ejemplo 16: Silenciamiento de Fc de anticuerpos

15 CD3/BCMA/CD38

Materiales y métodos

Afinidad de unión de CD3/BCMA/CD38 y trastuzumab IgG1 a

20 los receptores Fc humanos

Las mediciones se realizaron en un instrumento
Biacore 8K+ (Cytiva Life Sciences) y se analizaron con el
software Biacore Insight Evaluation (v2.0). Las mediciones
incluyeron muestras de concentración cero para referencia.
25 Las constantes cinéticas de unión de CD3/BCMA/CD38 al
dominio extracelular (ECD) de Fc γ RI humano recombinante

(Acrobiosystems, cat. Núm. FCA-H82E8) y al ECD de FcγR1la humano recombinante de producción interna (sec. con núm. de ident.: 601), ECD de FcγR1lb humano recombinante (sec. con núm. de ident.: 600), ECD de FcγR1lla humano recombinante (sec. con núm. de ident.: 599) y ECD de FcRn humano recombinante (sec. con núm. de ident.: 602 y sec. con núm. de ident.: 603) se compararon con las constantes cinéticas de unión del anticuerpo de referencia IgG1 clínicamente validado y de producción interna trastuzumab. Tabla 21:

10

Procedimiento para las mediciones de FcγRI, FcγR1la, FcγR1lb, FcγR1lla

Las mediciones se realizaron a través de la captura de proteína G de los anticuerpos usando un chip sensor recubierto de proteína G comercial (chip sensor de proteína G Serie S, Cytiva, cat. núm. 29179315). Cada ensayo consistió en una réplica de cada muestra de anticuerpo. El chip sensor de proteína G de la serie S se acopló al instrumento y se capturaron en la ruta de flujo 2 entre 290 y 380 RU de anticuerpos IgG1 CD3/BCMA/CD38 o trastuzumab, previamente diluidos a una concentración final de 4 µg/ml en regulador HBS-EP+ (Cytiva, cat. núm. BR100669). Se inyectaron ECD FcγRI humano (Acrobiosystems, cat. núm. FCA-H82E8), ECD FcγR1la humano (lote núm. P1749), ECD FcγR1lb humano (lote núm. P1739) y ECD FcγR1lla humano (lote núm. P1304) en la ruta de flujo 1 y la ruta de flujo

2 (la ruta de flujo 1 se usó como referencia) de acuerdo con las configuraciones experimentales descritas en la Tabla 19. Para el análisis de la unión a CD3/BCMA/CD38 y trastuzumab IgG1, se prepararon ECD de FcγRI humano, ECD de FcγRIIa humano, ECD de FcγRIIb humano y ECD de FcγRIIIa humano en una serie de diluciones 2x o 3x en regulador HBS-EP+, pH 7.4, a una concentración final 1x y se inyectaron en el orden descrito en la Tabla 20.

10 Procedimiento para las mediciones de FcRn

Las mediciones se realizaron a través de la captura de proteína L de los anticuerpos usando un chip sensor recubierto de proteína L comercial (chip sensor de proteína L serie S, Cytiva, número de catálogo 29205138). Todas las muestras de anticuerpos se midieron en tres ensayos independientes. Cada ensayo consistió en una réplica de cada muestra de anticuerpo. El chip sensor de proteína L de la serie S se acopló al instrumento y se capturaron en la ruta de flujo 2 entre 150 y 250 RU de anticuerpos IgG1 CD3/BCMA/CD38 o trastuzumab, previamente diluidos a una concentración final de 5 µg/ml en regulador HBS-EP+ (Cytiva, cat. núm. BR100669), ajustado a pH 6.0 con HCl. Se inyectó ECD de FcRn humano recombinante y microglobulina P2 en las vías de flujo 1 y 2 (la vía de flujo 1 se usó como referencia) de acuerdo con las configuraciones experimentales descritas en la

Tabla 19. Para el análisis de la unión a CD3/BCMA/CD38 y trastuzumab IgG1, se preparó ECD de FcRn humano en una serie de diluciones 2x en regulador HBS-EP+ pH 6.0 a una concentración final 1x y se inyectó en orden A1 como se describe en la Tabla 20.

Medición de afinidad	FcγRI	FcγRI1a, FcγRI1b, FcγRI1a	FcRn
Instrumento	Biacore 8K+		
Chip sensor	Sensor de proteína G de la serie S CHIP		Sensor de proteína L de la serie S CHIP
Ligando inmovilizado	N/A		
Ruta de flujo de inmovilización	N/A		
Ligandos capturados (RU)	CD3/BCMA/CD38 (340-390 RU) y Trastuzumab (380- 1800 RU)	CD3/BCMA/CD38 (7500-7660 RU) Trastuzumab (970-1080 RU)	CD3/BCMA/CD38 y Trastuzumab (300-360 RU)
Ruta de flujo de captura	2		
Caudal de captura (μL/min)	10		
Concentración de la molécula de captura (μg/ml)	4	CD3/BCMA/CD38: 4 Trastuzumab: 3	CD3/BCMA/CD38:4
Tiempo(s) de inyección de captura	25	20	30
Analito	Fcγ RI	FcγRI1a, FcγRI1b, FcγRI1a	FcRn
Caudal de inyección (μL/min)	30		
Regulador en ejecución	HBS-EP+ pH 7.4		HBS-EP+pH6
Temperatura de funcionamiento	25 °C		
Temperatura del compartimento de muestra	25 °C		
Ruta del flujo de inyección	1>2		
Tiempo de inyección (min)	4,5	2	3
Tiempo de disociación (min)	12	2	10
Captura la regeneración	10 mM de glicina, pH 1.5, 60 s		10 mM de glicina, pH 1.7, 120 s
Método de ajuste de datos	Cinética 1:1, parámetros	Afinidad en estado	Afinidad en estado

experimentales	predeterminados	estacionario	estacionario
Resta de referencia	Doble: superficie de referencia sin ligando y en blanco (inyección de regulador de ejecución)		

Tabla 19. Configuraciones experimentales para mediciones de afinidad de CD3/BCMA/CD38 y trastuzumab IgG1 a receptores Fc humanos.

5

	Concentraciones de proteína del receptor Fc (nM)								
Analito de receptor Fc	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Fcγ RI	0	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	-
FcγRIIa	0	39	78	156	312	625	1250	2500	5000
FcγRIIb	0	39	78	156	312	625	1250	2500	5000
FcγRIIIa	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	400
FcRn	0	15,6	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000

Tabla 20: Serie de muestras de inyección de receptores Fc

Resultados y conclusiones

10 Para evitar la activación de células T mediada por el receptor Fcγ en ausencia de interacción de células diana y ADCC y CDC contra células T, se introdujeron sustituciones L234A/L235A (LALA)/P329A en los dominios CH2 de las moléculas BEAT CD38/CD3. Se ha demostrado que

15 la doble mutación LALA reduce la unión de las moléculas IgG1 humanas a CD64, CD32a y CD16a humanas (Hezareh et al., 2001, J Virol, 75(24): 12161-12168), mientras que sólo reduce ligeramente la unión del dominio Fc de IgG a FcRn, que ocurre en la interfaz CH2-CH3 de IgG (Wines et

20 al., J Immunol., 2001;166(3):1781-9). Además de eliminar

la unión a FcγR, se ha demostrado que la doble mutación L234A, L235A elimina la unión a C1q (Hezareh et al., 2001, J Virol, 75(24): 12161-12168). C1q es la subunidad de reconocimiento de C1, el complejo que desencadena la
5 activación de la vía clásica del complemento. Las mutaciones LALA solamente en BEAT Fc reducen las funciones de ADCC y CDC pero no eliminan completamente la unión a los receptores Fc, por lo tanto, hemos añadido P329A, una mutación que por sí sola reduce la unión a los
10 receptores Fc (Shields et al. J. Biol. Chem, 2001, 276(9), 6591-6604), para silenciar aún más el Fc de los constructo de CD3/BCMA/CD38. Como resultado, no se pudo observar ninguna unión a FcγR1a, I1a (sec. con núm. de ident.: 601), I1a (sec. con núm. de ident.: 599) y lib
15 (sec. con núm. de ident.: 600) como se muestra en la Tabla 21 a continuación hasta las concentraciones máximas mencionadas en la Tabla 20. La unión a FcRn (sec. con núm. de ident.: 602 y sec. con núm. de ident.: 603) se conservó de manera similar al anticuerpo de referencia
20 trastuzumab IgG1.

La Figura 14 muestra sensogramas representativos e individuales de unión de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 -115, -117, -118 y -119 a los diferentes receptores Fc probados en este ejemplo, o la
25 falta de unión de estos, así como la técnica de orientación e inmovilización usada para el análisis.

	Afinidad por el receptor Fc humano (K_D , nM $\pm$ desviación estándar)				
	CD3/BCMA/CD38-115 (P1854)	CD3/BCMA/CD38-117 (P1842)	CD3/BCMA/CD38-118 (P1854)	CD3/BCMA/CD38-119 (P1842)	Trastuzumab (pJFR148)
Fc γ RI humano	No se une	No se une	No se une	No se une	0,196 $\pm$ 0,006
Fc γ RIIA humano	No se une	No se une	No se une	No se une	550 $\pm$ 20
Fc γ RIIB humano	No se une	No se une	No se une	No se une	2070 $\pm$ 90
Fc γ RIIIA humano	No se une	No se une	No se une	No se une	106 $\pm$ 3
FcRn humano	250 $\pm$ 21	235 $\pm$ 13	221 $\pm$ 16	240 $\pm$ 9	231 $\pm$ 15

Tabla 21: Unión a los receptores Fc de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 y del anticuerpo de referencia trastuzumab.

5

Ejemplo 17: AC-SINS de candidatos CD3/BCMA/CD38

Materiales y métodos:

10 Espectroscopia de nanopartículas de autointeracción por captura de afinidad (AC-SINS)

Antes de recubrir las partículas de oro, se analizaron los anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG humana Fc (AffiniPure Goat AntiHuman IgG, fragmento Fey
15 específico, Jackson ImmunoResearch, cat. núm. 109-005-098-JIR; “captura”) y anticuerpos no específicos de cabra ChromPure (ChromPure Goat IgG, molécula completa, policlonal, Jackson ImmunoResearch, cat núm. 005-000-003; “sin captura”) se intercambiaron el regulador por un

regulador de acetato de Na 20 mM recién preparado (pH 4.3, prefiltrado a través de un “Rapid”-Filtermax de 0,22 μ m (“Rapid”-Filtermax, PES, 0,22 μ m, TPP, cat. núm. 99255)) usando columnas de desalinización Zeba Spin (columnas de desalinización Zeba™ Spin, 7K MWCO, ThermoFisher, cat. núm. 89882), seguido de un ajuste de la concentración a 0,4 mg/ml usando un regulador de acetato de sodio (Acetato de sodio anhidro para biología molecular, >99 %, Sigma, cat. núm. S2889-1 kg). Se añadió una relación de volumen premezclada de 4:1 de solución de IgG de captura:no captura a una solución de nanopartículas de soles de oro no conjugados de 20 nm (AuNP, prediluidas 0,67 veces en H₂O) hasta una relación de volumen final de 1:9 de solución de recubrimiento:AuNP. Las AuNP se recubrieron durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido del bloqueo de los sitios vacíos en las AuNP mediante la adición de PEG tiolado (poli (etilenglicol) metil éter tiol, Sigma-Aldrich, cat. núm. 729140-1G) a una concentración final de 0,1 μ M. Después, las AuNP recubiertas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Medición AC-SINS: La solución de AuNP prerrecubierta se centrifugó a 20000 refracción a 4 °C durante 10 minutos. Alrededor del 95 % del sobrenadante se eliminó con una pipeta. Después, los AuNP se resuspendieron en el 10 % del volumen inicial en PBS. Se mezclaron 10 μ l

del AuNP resuspendido con 100 μ l del anticuerpo de prueba (CD3/BCMA/CD38-115, 117, 118 o 119), previamente diluido a una concentración de 100 μ g/ml, en una placa de polipropileno de 96 pocillos (Nunc™ 96-well Polypropylene Storage Microplates, ThermoFisher, cat. no. 249946). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente a 700 RPM en un agitador de placas, se transfirieron 100 μ l de las soluciones a una placa de poliestireno transparente a los rayos UV de 96 pocillos (Corning® 96-well Clear Flat Bottom UV-Transparent Microplate, without Lid, Nonsterile, Corning, cat. núm. 3635) y los datos de absorbancia se recopilaban de 450 nm a 650 nm con un incremento de 1 nm en un lector de placas Synergy Neo (Synergy Neo HTS Multi Mode Reader, BioTek Instruments).

Los datos de absorbancia sin procesar se exportaron a Excel y se analizaron usando la macro de Excel usada por el laboratorio Tessier P., de la Universidad de Michigan (Liu et al., 2013, mAbs, doi: 10.4161/mabs.27431). Brevemente, “[...] La macro primero identifica la longitud de onda de máxima absorbancia en los datos sin procesar y después almacena los 20 puntos de datos alrededor de esa longitud de onda en una matriz. Cada punto se promedia con los puntos inmediatamente anteriores y posteriores para reducir el error causado por el ruido. Usando la función Linest en Excel, se ajusta un polinomio de segundo orden a este conjunto de datos. Los coeficientes se usan para

calcular la longitud de onda donde la pendiente es igual a
cero y después la macro determina si este punto es máximo o
mínimo. En caso de un máximo, se devuelve la longitud de
onda calculada [...]” (Liu et al., 2013, mAbs, doi:
5 10.4161/mabs.27431). Cada anticuerpo se midió por duplicado
y se determinó el cambio de longitud de onda del plasmón
($\Delta\lambda_{\text{max}}$) de cada anticuerpo se calculó restando la longitud
de onda del plasmón en la absorbancia máxima (λ_{max}) de PBS
del λ_{max} promedio del anticuerpo.

10

Resultados y conclusiones

La propensión de una selección de CD3/BCMA/CD38 a
autoasociarse se evaluó mediante espectroscopia de
nanopartículas de autointeracción por captura de afinidad
15 (Figura 15). CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119
mostraron una propensión muy baja a autoasociarse a juzgar
por el bajo valor de desplazamiento de la longitud de onda
del plasmón ($\Delta\lambda_{\text{max}}$), mientras que CD3/BCMA/CD38-115 y
CD3/BCMA/CD38-117 tuvieron un desplazamiento de la longitud
20 de onda del plasmón alto compatible con una alta propensión
a autoasociarse (Figura 15). Para sorpresa de los
inventores, CD3/BCMA/CD38-118 mostró un mejor perfil de
capacidad de desarrollo relacionado con la propensión a
autoasociarse que CD3/BCMA/CD38-115, a pesar de que las dos
25 construcciones eran una combinación de los mismos tres
aglutinantes, aunque en una orientación espacial diferente.

Esta propiedad confiere una ventaja a CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 para su desarrollo como terapias de anticuerpos.

5 Ejemplo 18: Caracterización adicional de los anticuerpos
CD3/BCMA/CD38

Ejemplo 18 (a): Unión a células T primarias humanas

10 Materiales y métodos

Se recolectaron PMBC humanas a partir de capas hinchadas/filtros de aféresis obtenidas del Centro de Transfusión de La Chaux-de-Fonds (Suiza) usando aislamiento de gradiente de densidad de Ficoll®. Las
15 células T se aislaron (StemCell Technologies, 17951) y se congelaron el mismo día de la cosecha. Las células se descongelaron en medio RPMI completo precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no
20 esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante la noche a 2×10^6 células/ml. Las células se sembraron a razón de 1×10^5 células/pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. La placa se centrifugó a 350 g
25 durante 3 min a 4 °C y las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS frío que contenía diluciones

seriadas de candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119, puntos de referencia (BEAT CD3/CD38, 83A10-TCBcv, TNB-F2B BEAT Fc) y control (CD3/BCMA/CD38-085) a partir de 800 nM y diluidos 3 veces. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces con regulador FACS a 350 g durante 3 minutos y se resuspendieron en 25 µl de un cóctel de anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG humana AlexaFluor647 (Biolegend, 409316) y anticuerpos de cotinción para CD38 humano (Anti-CD38 multiepitopo, Cytognos, CYT-38F2) diluidos 1/200 y 1/10 en regulador FACS, respectivamente. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 50 µl de regulador FACS que contenía tinción de células muertas SYTOX Blue (ThermoFisher Scientific, S34857) diluida 1/2000. Las muestras se adquirieron en un instrumento iQue Screener Plus (IntelliCyt). Las células se clasificaron según el tamaño de FSC vs SSC y se excluyeron los desechos y los dobletes. Finalmente, las células viables fueron seleccionadas para las células CD38-T. Esta población se analizó para determinar la intensidad de fluorescencia media geométrica (geomean) de AlexaFluor647 usando el software iQue Forecyt®. En las etapas posteriores del análisis solo se consideraron las muestras que mostraban al menos 200 células en la puerta final. La intensidad de fluorescencia geomean relativa (RFI) se calculó restando

la fluorescencia del control negativo (CD3/BCMA/CD38_085) a la fluorescencia de los tratamientos en cada dilución. Finalmente, los valores de intensidad de fluorescencia geoméan relativa se graficaron usando el software Prism (GraphPad). Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) y la unión máxima se determinaron usando un ajuste de curva de unión de un sitio en datos no transformados (Prism). La intensidad de fluorescencia geomedia relativa y K_D se graficó usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 16. Los valores máximos de unión y K_D se resumen en la Tabla 22. Se realizaron dos experimentos independientes con cada candidato con un total de seis donantes.

15 Resultados y conclusiones

Las curvas de unión de los candidatos CD3/BCMA/CD38 y los puntos de referencia en células T CD38- humanas primarias se muestran en la Figura 16 y valores de la constante de disociación de equilibrio asociada (K_D) en la Figura 16B, así como los informados en la Tabla 22 junto con la unión máxima. Los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 mostraron curvas de unión comparables a las de BEAT CD3/CD38 con mediciones de K_D de $152,2 \pm 51,1$ nM (CD3/BCMA/CD38-118), $133,5 \pm 40,3$ nM (CD3/BCMA/CD38-119) y $152,6 \pm 40,9$ nM (BEAT CD3/CD38) respectivamente, así como unión máxima (CD3/BCMA/CD38-118

12'000 $\pm$ 3'000 RFI; CD3/BCMA/CD38-119 18'000 $\pm$ 3'000 RFI; BEAT CD3/CD38 40'000 $\pm$ 8'000 RFI) mientras que los puntos de referencia muestran K_D y vinculación máxima muy diferentes: 83A10-TCBcv (K_D 80,0 $\pm$ 10,6; Unión máxima 103'000 $\pm$ 13'000 RFI) y TNB-F2B BEAT Fc (K_D No cuantificable; Unión máxima 60 $\pm$ 20 RFI).

Molécula	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)
BEAT CD3/CD38	40'000 $\pm$ 8'000	152,6 $\pm$ 40,9
TNB-F2B BATE FC	60 $\pm$ 30	N.Q.
83A10-TCBcv	103'000 $\pm$ 14'000	80,0 $\pm$ 10,6
CD3/BCMA/CD38-118	12'000 $\pm$ 3'000	152,2 $\pm$ 51,1
CD3/BCMA/CD38-119	18'000 $\pm$ 3'000	133,5 $\pm$ 40,3

Tabla 22: Los candidatos CD3/BCMA/CD38 se unen a las células T humanas CD38 negativas. La tabla muestra K_D en nM y valores de unión máxima (intensidad de fluorescencia relativa, RFI) en células T determinados mediante experimentos de citometría de flujo. Cada valor es la media $\pm$ desviación estándar de seis donantes de células T de dos experimentos independientes. NQ significa no cuantificable (sin vinculación o mala calidad de ajuste).

Ejemplo 18 (b): Unión a líneas celulares de mieloma múltiple

20

Materiales y métodos

NCI-H929, MOLP-8 y KMS-12-BM se sembraron a 1×10^5 células/pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las placas se centrifugaron a 350 g durante 3 min a 4 °C y las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS frío que contenía diluciones seriadas de candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119, referencia (83A10-TCBcv) y control (CD3/BCMA/CD38-085) a partir de 800 nM y diluidos por 3. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces con regulador FACS a 350 g durante 3 minutos y se resuspendieron en 25 µl de un anticuerpo secundario monoclonal de IgG antihumana AlexaFluor647 (Biolegend, 409316) diluido 1/200 en regulador FACS. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 50 µl de regulador FACS que contenía tinción de células muertas SYTOX Blue (ThermoFisher Scientific, S34857) diluida 1/2000. Las muestras se adquirieron en un instrumento iQue Screener Plus (IntelliCyt). Las células se clasificaron basadas en el tamaño de FSC vs SSC y se excluyeron los restos, los dobletes y las células muertas. Se analizó la población para determinar la intensidad de fluorescencia media geométrica (geomean) de AlexaFluor647 usando el software iQue Forecyt*. En las etapas posteriores del análisis solo se consideraron las muestras que mostraban al menos 200 células en la puerta final. La intensidad de fluorescencia geomean relativa (RFI) se calculó restando la fluorescencia

del control de isotipo a la fluorescencia de los tratamientos en cada dilución. Finalmente, los valores de intensidad de fluorescencia geomean relativa se graficaron usando el software Prism (GraphPad). Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) y la unión máxima se determinaron usando un ajuste de curva de unión de un sitio en datos no transformados (Prism). La intensidad de fluorescencia geomean relativa se graficó usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 17. Los valores máximos de unión y K_D se resumen en la Tabla 23. Se realizaron tres experimentos independientes con cada candidato.

Resultados y conclusiones

Los resultados de la Figura 17 muestran las curvas de unión de los candidatos CD3/BCMA/CD38 y los puntos de referencia en líneas celulares de mieloma múltiple que muestran expresión variable de CD38 y BCMA. Los valores de la constante de disociación de equilibrio asociada (K_D) y de unión máxima se informan en la Tabla 23.

Los candidatos CD3/BCMA/CD38 mostraron una unión máxima superior en comparación con el punto de referencia CD3xBCMA 83A10-TCBcv en todas las líneas celulares. En la línea celular KMS-12-BM (caracterizada como células de baja expresión de BCMA y CD38), el

aumento en la unión máxima en comparación con 83A10-TCBcv fue 2,6 veces y 1,5 veces mayor para los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 respectivamente. En la línea celular MOLP-8 (caracterizada como células con baja expresión de BCMA y alta de CD38), los candidatos CD3/BCMA/CD38 mostraron una unión máxima 80 o 44 veces mayor en comparación con 83A10-TCBcv. En las células NCI-H929 (caracterizadas como células que expresan el medio BCMA y CD38), la unión máxima fue 1,5 veces y 1,3 veces mayor para los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 respectivamente, en comparación con el punto de referencia CD3xBCMA 83A10-TCBcv. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 mostraron curvas de unión comparables con medidas de K_D de rango nanomolar bajas de 7 y 12 nM en KMS-12-BM, 3 y 31 nM en MOLP-8 y 3 y 12 nM en NCI-H929, mientras que 83A10-TCBcv mostró el mismo rango de unión que el candidato CD3/BCMA/CD38-118 con 2, 5 y 4 nM, respectivamente.

	KMS-12-BM		MOLP-8		NCI-H929 WT	
	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)
83A10-TCBcv	40'132	2	11'112	5	218'894	4
CD3/BCMA/CD38-118	104'284	7	891'877	3	322'578	3
CD3/BCMA/CD38-119	61'483	12	490'400	31	293'847	12

20

Tabla 23: Los candidatos CD3/BCMA/CD38 se unen a líneas celulares que muestran expresión variable de CD38 y BCMA.

La tabla muestra K_D en nM y valores máximos de unión en
líneas celulares que muestran expresión variable de CD38
y BCMA, KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929, determinados por
citometría de flujo. Cada valor es la media de 3
5 mediciones de 3 experimentos individuales.

En conjunto, los datos sugieren que es probable
que los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 se unan
preferentemente a células tumorales que expresan BCMA y
CD38 con altas afinidades de unión aparentes en lugar de
10 a células T.

Ejemplo 18 (c): Análisis estadístico del ensayo RDL de
células tumorales NCI-H929, MOLP-8 y KMS-12-BM que
expresan diversos niveles de BCMA y CD38

15

Materiales y métodos

Los ensayos se realizaron siguiendo las mismas
metodologías y materiales descritos anteriormente.

Además, se aplicaron análisis estadísticos para
20 comparar la potencia de muerte de los candidatos
CD3/BCMA/CD38-118 y -119 con cada punto de referencia
(BEAT CD3/CD38, 83A10-TCBcv, TNB-F2B BEAT Fc) en las
líneas celulares de mieloma múltiple NCI-H929, MOLP-8 y
KMS-12-BM. La EC_{50} de muertes específicas extraídas
25 previamente se graficaron usando el software Prism
(GraphPad) como se muestra en la Figura 18 y se

resumieron (media +/- desviación estándar) en la Tabla 24. Las medias de EC₅₀ se compararon usando un ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD (*P<0,05).

5

Resultados y conclusiones

Se probaron los CD3/BCMA/CD38-118 y -119 para determinar su potencia de muerte in vitro contra las líneas de células de mieloma KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929 con diferentes niveles de expresión de CD38 y BCMA en un ensayo RDL. Como se muestra en la Figura 18, CD3/BCMA/CD38-118 y -119 indujeron una potente muerte de todas las líneas de células de mieloma analizadas, lo que indica que la muerte mediada por la actividad citotóxica redirigida de las células T induce una actividad citotóxica eficiente contra estas líneas celulares. Los valores de EC₅₀ para la muerte mediada por CD3/BCMA/CD38-118 de KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929 se determinaron como 0,4 ± 0,2, 0,7 ± 0,7 y 1,2 ± 0,9 pM, respectivamente (Tabla 24). El CD3/BCMA/CD38-118 exhibió un aumento significativo de 41,4 veces en la potencia de muerte en comparación con el anticuerpo 83A10-TCBcv contra células MOLP-8 (caracterizadas como células con baja expresión de BCMA y alta expresión de CD38). La actividad citotóxica de CD3/BCMA/CD38-118 también fue superior a la lisis redirigida por 83A10-TCBcv de las células KMS-12-BM

(caracterizadas como células de baja expresión de BCMA y CD38) y NCI-H929 (caracterizadas como células de expresión media de BCMA y CD38) que mostraron valores de EC₅₀ 7,8 o 2,8 veces menor, respectivamente (Tabla 24).

5 CD3/BCMA/CD38-119 desencadenó una muerte superior en comparación con el punto de referencia 83A10-TCBcv de la línea celular MOLP-8 (disminución significativa de 5,9 veces de EC₅₀) y la muerte comparable de las líneas celulares KMS-12-BM y NCI-H929. TNB-F2B BEAT Fc

10 desencadenó la potencia de muerte más débil en comparación con otros tratamientos (estadísticamente significativo en todas las líneas celulares). En general, el análisis de datos mostró una potente actividad citotóxica de CD3/BCMA/CD38-118 y -119 con valores de EC₅₀ en el rango

15 picomolar bajo contra líneas de células de mieloma con niveles variables de expresión de CD38 y BCMA. La actividad citotóxica de CD3/BCMA/CD38-118 y -119 con brazos de unión a CD38 y BCMA está fuertemente mejorada en comparación con los puntos de referencia, BEAT CD3/CD38,

20 dirigido solo a CD38 y TNB-F2B BEAT Fc y 83A10-TCBcv, dirigido solo a BCMA.

Tratamiento	Tipo	Anti-CD38	EC ₅₀ de muerte específica ± DE [pM]		
			KMS-12-BM	MOLP-8	NCI-H929
BEAT CD3/CD38	CD3xCD38	h9G7	3,2 ± 1 *	3,1 ± 3 * [#]	6,5 ± 4,8 *
TNB-F2B BATE FC	CD3xBCMA	Ninguno	25,1 ± 10,3	100,4 ± 62,8	265,1 ± 104,7
83A10-TCBcv	CD3xBCMA	Ninguno	3,1±1,1 *	29 ± 9,7 ⁺	3,4 ± 1,5 *
CD3/BCMA/CD38-118	TREAT BO	B3-C11	0,4 ± 0,2 * ^{##}	0,7 ± 0,7 * ^{##}	1,2 ±0,9 * ^{##}

CD3/BCMA/CD38-119	TREAT BO	B3	3,3 ±1,3 *	4,9 ± 4,7 *#	3,2 ±1,4*
-------------------	----------	----	------------	--------------	-----------

Tabla 24: El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de líneas celulares de mieloma

múltiple que muestran expresión variable de CD38 y BCMA. La

5 tabla muestra los valores de la mitad de la concentración

máxima efectiva de muerte (EC₅₀) determinados a partir del

ensayo de lisis dirigida en múltiples líneas celulares

que muestran expresión variable de CD38 y BCMA, KMS-12-BM,

MOLP-8 o NCI-H929, durante 72 h y usando una relación

10 efector-diana de 5:1. Cada valor de EC₅₀ es la media +/-

desviación estándar de cinco o seis mediciones de tres

experimentos individuales. Las medias se compararon usando

un ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación

post-hoc de Tukey HSD. NQ significa no cuantificable (sin

15 vinculación o mala calidad de ajuste). * significa

estadísticamente significativo en comparación con TNB-F2B

BEAT Fc. # significa estadísticamente significativo en

comparación con 83A10-TCBcv. + significa estadísticamente

significativo en comparación con BEAT CD3/CD38.

20

Ejemplo 18 (d): Análisis de activación y proliferación de

células T a partir del ensayo RDL de células tumorales

KMS-12-BM que expresan niveles bajos de BCMA y CD38

25 Materiales y métodos

Para evaluar si los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 indujeron la activación y proliferación de células T, se monitorearon lecturas adicionales mediante citometría de flujo en paralelo a la muerte de células diana. Las células se tiñeron con anti-CD4 humano-BrilliantViolet785 (BioLegend, Scientific, 317442, dilución 1/100), CD8-APC-eFluor780 (ThermoFisher Scientific, 47-0087-42, dilución 1/200) y CD25-PE-Cyanine7 (ThermoFisher Scientific, 25-0259-42, dilución 1/100) diluidos en regulador FACS. Como se describió anteriormente, las muestras se adquirieron en un instrumento iQue (Beckman Coulter). Específicamente, los PBMC se seleccionaron en células eFluor670/eFluor450+ y después las células T CD4⁺ y CD8⁺ fueron bloqueadas. La activación de las células T se determinó evaluando el porcentaje de células CD25 positivas activadas por células T CD4⁺ o CD8⁺ y la proliferación se evaluaron usando el método de dilución del tinte a través de múltiples rondas de división celular (pérdida del marcado eF450). Los porcentajes de valores de células T activadas (CD25⁺ de células T CD4 o CD8) así como porcentajes de proliferación (Proliferación de células T CD4⁺ o CD8⁺) se extrajeron. La mitad de la concentración efectiva máxima o EC₅₀ de activación o proliferación se calculó a partir de los porcentajes extraídos mediante regresión no lineal de respuesta a la dosis sigmoidea. Los valores de EC₅₀

determinados en la línea celular de mieloma múltiple KMS-12-BM se muestran en la Figura 19. También se realizó un análisis estadístico y se compararon las medias de EC_{50} usando un ANOVA unidireccional pareado seguido de una
5 comparación post-hoc de Tukey HSD.

Resultados y conclusiones

El análisis de la expresión del marcador de activación CD25 en células T $CD4^+$ y $CD8^+$ en el ensayo
10 KMS-12-BM RDL revelaron una regulación positiva de CD25 con valores de EC_{50} de 28 y 5 pM y una inducción de proliferación a nivel de valores de EC_{50} de 19 y 4 pM para CD3/BCMA/CD38-118, mostrando una mayor inducción de proliferación y activación de células T $CD8^+$ citotóxicas
15 comparadas con 83A10-TCBcv. CD3/BCMA/CD38-118 demostró una activación y proliferación de células T comparables en comparación con BEAT CD3/CD38. CD3/BCMA/CD38-119 indujo una activación y proliferación de células T comparables en comparación con TNB-F2B BEAT Fc.
20 CD3/BCMA/CD38-119 indujo una menor activación y proliferación de células T $CD4^+$ en comparación con BEAT CD3/CD38 y 83A10-TCBcv.

Ejemplo 18 (e): Ensayo RDL de células tumorales KMS-12-BM
que expresan niveles bajos de BCMA y CD38 y el efecto de
APRIL soluble y CD38 sobre la potencia de muerte

5 Materiales y métodos

Se sabe que los niveles circulantes de CD38 soluble y APRIL en sangre de pacientes con mieloma múltiple son significativamente más altos que los niveles circulantes de CD38 soluble y APRIL en sangre de donantes
10 sanos (promedio de 100 ng/ml y 15 ng/ml para APRIL soluble, respectivamente (Moreaux et al, 2004); promedio de 0,4 ng/ml y 0,1 ng/ml para CD38 soluble, respectivamente (Zuch de Zafra et al, 2019). En circulación, el CD38 soluble o APRIL presenta un riesgo
15 potencial de hundimiento, disminuyendo la posibilidad de que la molécula se una a las células tumorales, impactando así la potencia de muerte. La actividad de muerte de estos TREATS CD3/BCMA/CD38 se evaluó como se describe en el Ejemplo 13, en presencia de altos niveles
20 de APRIL y CD38 solubles, suplementados a concentraciones finales de 100 ng/ml o 2,8 ng/ml, respectivamente. En estos experimentos, la dosis inicial usada fue de 200 nM. Las medias de EC₅₀ y las desviaciones estándar se informan en pM en la Tabla 25, así como la diferencia en
25 comparación con la ausencia de receptores solubles. Se

realizaron dos experimentos independientes con cada candidato para un total de seis donantes.

Resultados y conclusiones

5 Como se muestra en la Tabla 25, los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 se vieron menos afectados por la presencia de APRIL soluble en comparación con el punto de referencia 83A10-TCBcv (EC_{50} 63 veces mayor muerte en presencia de APRIL). El CD38 soluble no afectó la potencia
10 de muerte de ninguna molécula.

Molécula	EC_{50} (pM)			EC_{50} de diferencia de veces	
	No soluble	APRIL (100 ng/ml)	SCD38 (2,8 ng/ml)	APRIL (100 ng/ml)	sCD38 (2,8 ng/ml)
BEAT CD3/CD38	4,1 ± 1,3	4,4 ± 1,2	2,9 ± 0,9	1	1
TNB-F2B BATE FC	31,9 ± 9,4	273,5 ± 154,8	15,6 ± 6,2	9	0,5
83A10-TCBcv	2,5 ± 0	154,3 ± 53,3	2,5 ± 0,5	63	1
CD3/BCMA/CD38-118	0,5 ± 0,3	3 ± 0,8	0,8 ± 0,7	6	2
CD3/BCMA/CD38-119	5,4 ± 3	42,8 ± 20,3	4,7 ± 2,8	8	1

Tabla 25: Los candidatos CD3/BCMA/CD38 desencadenan la muerte de células KMS-12-BM en presencia de APRIL soluble o CD38 soluble en el ensayo de lisis redirigida. La tabla muestra la media +/- desviación estándar de EC_{50} de muerte determinada a partir de experimentos de lisis redirigida en la línea celular KMS-12-BM incubadas con o sin APRIL o CD38 soluble (100 ng/ml y 2,8 ng/ml, respectivamente). Se calculó la diferencia de pliegues para indicar el impacto en la potencia de muerte (media
15
20

de EC₅₀ con molécula soluble / media de EC₅₀ sin molécula soluble). La tabla muestra datos de tres donantes de uno de cada dos experimentos representativos.

5 Ejemplo 18 (f): Análisis de cuantificación de citocinas a partir de la actividad local y fuera del tumor

Materiales y métodos

El protocolo del ensayo en la diana y fuera del
10 tumor se describió previamente en el Ejemplo 13. A partir de los mismos experimentos, se cuantificaron las citocinas usando el kit Meso Scale Discovery V-PLEX Custom Human Biomarkers (Human IL-2, IL-6, IL-10, IFN-gamma, TNF-alpha) (MesoScale Discovery, K151A9H-2)
15 siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores de cuantificación se graficaron usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 20. A partir de estos datos, se determinó el umbral de inducción de citocinas. El umbral de inducción se define por la
20 primera dosis que muestra una liberación significativa de citoquinas y se obtuvo usando el software JMP (SAS), usando el modelo de mínimos cuadrados anidados seguido de una comparación post-hoc de Dunnet en comparación con el control negativo (CD3/BCMA/CD38_085), el valor $p < 0,05$
25 se consideró como estadísticamente significativo. Se usó como referencia la referencia 83A10-TCBcv. Los candidatos

CD3/BCMA/CD38-118 y 119 se compararon con el control positivo, PBMC estimulados con PHA. Los valores umbral de inducción se resumen en la Tabla 26.

5 Resultados y conclusiones

Los marcadores solubles humanos IL-2, IL-6, IL-10, IFN-gamma y TNF-alfa se cuantificaron a partir de un ensayo de PBMC de alta densidad. Los resultados de la Figura 20 muestran que los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 inducen cierta liberación de citocinas, aunque en un grado mucho menor en comparación con el control positivo (PHA). Como se resume en la Tabla 26, los umbrales de inducción de citocinas muestran que los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 indujeron la liberación de citocinas asociada con la actividad fuera del tumor en la diana en concentraciones de 8 a 200 nM.

Muestra	IFN-gamma	TNF-alfa	IL-2	IL-6	IL-10
CD3/CD38/BCMA-118	40	40	>200	>200	8
CD3/CD38/BCMA-119	200	200	>200	>200	>200
83A10-TCBcv	40	200	8	200	40

Tabla 26: Los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119 inducen la liberación de citocinas asociadas con la actividad fuera del tumor en un grado similar o menor en comparación con el punto de referencia 83A10-TCBcv. La tabla muestra el umbral de activación en nM (excepto anti-CD3+ anti-CD28

y PHA) determinado a partir de experimentos de PBMC de alta densidad y medido por la liberación de citocinas de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-6 e IL-10.

5 Ejemplo 18 (g): Unión a los glóbulos rojos

Materiales y métodos

Cien microlitros de sangre completa recién extraída con EDTA (centro de transfusión de Berna, 92000) se incubaron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos con una dosis-respuesta (800, 9,88, 0,12 nM) de CD3/BCMA/CD38-118, -119 candidatos o puntos de referencia (BEAT CD3/CD38, 83A10-TCBcv, TNB-F2B BEAT Fc, daratumumab (sec. con núm. de ident.:565 y sec. con núm. de ident.:566), magrolimab (sec. con núm. de ident.:567 y sec. con núm. de ident.:568)) y anticuerpo secundario Fab de anti-IgG humana (H+L) Alexa-Fluor488 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, 109-547-003) durante 20 min a 4 °C. Después de la incubación, cada condición se diluyó 1/1600 en una nueva placa de fondo redondo de 96 pocillos en regulador FACS que contenía azida. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 200 µl de regulador FACS que contenía azida. Las muestras se adquirieron en un instrumento CytoFlex (Beckman Coulter). Las células se seleccionaron basado en el tamaño en FSC vs y se analizaron para determinar la intensidad de

fluorescencia media geométrica (geomeia) de AlexaFluor488 usando el software FlowJo. En las etapas posteriores del análisis solo se consideraron las muestras que mostraban al menos 500 eventos en la puerta final. Los valores medios geométricos de intensidad de fluorescencia se graficaron finalmente usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 21. Se determinó el área bajo la curva (AUC) de una curva de respuesta a la dosis para cada donante. Las medias se compararon usando un ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Dunnett con daratumumab (* $P < 0,05$). Se realizaron dos experimentos independientes con cada candidato para un total de seis donantes.

15 Resultados y conclusiones

La figura 21A muestra que ninguno de los anticuerpos analizados, incluidos los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119, mostraron unión a los glóbulos rojos en sangre completa humana, excepto el control positivo magrolimab y daratumumab en la dosis más alta (800 nM). La Figura 21B muestra el área bajo las curvas (AUC) para cada tratamiento y destaca que magrolimab y daratumumab mostraron una unión significativa a los glóbulos rojos, mientras que el candidato CD3/BCMA/CD38-118 y -119, así como BEAT CD3/CD38, 83A10-TCBcv y TNB-F2B BEAT Fc no se unieron a los glóbulos rojos.

Ejemplo 18 (h): Hemaglutinación

Materiales y métodos

5 Los candidatos o controles CD3/BCMA/CD38-118 y
-119 (BEAT CD3/CD38, 83A10-TCBcv, TNB-F2B BEAT Fc,
daratumumab, magrolimab) se prepararon concentrados 3X en
PBS estéril. Después se añadieron cincuenta microlitros
de una suspensión de glóbulos rojos al 0,8 % preparada a
10 partir de sangre entera fresca y 25 µl de cada dilución
de anticuerpo (220, 1,25 y 0,07 nM) en cada columna de la
tarjeta de identificación Coombs anti-IgG. Las tarjetas
se incubaron a 37 °C durante 15 minutos y, después, se
centrifugaron en la centrífuga de ID-20. Cada microtubo
15 de la tarjeta de identificación contiene inmunoglobulina
antihumana anti-IgG (conejo) dentro de una matriz de gel.
La columna de gel actúa como un filtro que atrapa los
glóbulos rojos aglutinados a medida que pasan a través de
la columna de gel durante la centrifugación de la
20 tarjeta. La columna de gel separa los glóbulos rojos
aglutinados de los glóbulos rojos no aglutinados basados
en el tamaño. Cualquier glóbulo rojo aglutinado se
captura en la parte superior de o a lo largo de la
columna de gel, y los glóbulos rojos no aglutinados
25 descienden hasta la parte inferior del microtubo 25
formando un gránulo. La medida de la aglutinación se

calificó de 0 (sin aglutinación) a 4 (aglutinación completa) como se ilustra en la Figura 22. Se realizaron dos experimentos independientes con cada candidato para un total de seis donantes.

5

Resultados y conclusiones

La figura 22 muestra que ninguno de los anticuerpos analizados, incluidos los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119, sensibilizaron a los glóbulos rojos a la hemaglutinación, excepto los tratamientos con magrolimab y daratumumab en las dos dosis más altas (220 y 1,25 nM). El control positivo, magrolimab, sensibilizó a los glóbulos rojos a la hemaglutinación a niveles máximos a 220 nM y 1,25 nM, así como parcialmente a 0,007 nM. Daratumumab sensibilizó parcialmente los glóbulos rojos a la hemaglutinación a 220 nM y 1,25 nM. Los candidatos CD3/BCMA/CD38-118 y -119, así como 83A10-TCBcv y TNB-F2B BEAT Fc no sensibilizaron a los glóbulos rojos a la hemaglutinación.

20

Ejemplo 18 (i): Ensayo de muerte con múltiples modos de acción

Materiales y métodos

25

Para comparar más a fondo la potencia de muerte de los candidatos CD3/BCMA/CD38-118, -119 con los puntos

de referencia anti-CD38, se usó un ensayo que recapitula múltiples modos de acción de muerte (mediado por Fc, mediado por células T, mediado por complemento) usando la línea de células de mieloma múltiple NCI-H929.

5 Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos obtenidas del Centro de Transfusión de La Chaux-de-Fonds/Berna (Suiza) mediante aislamiento en gradiente de densidad de Ficoll y se congelaron en medio
10 CryoStor10 (Stemcell, cat. núm.: 07930). Las células se descongelaron en un medio RPMI completo precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante la
15 noche a 2×10^6 células/ml. El día del ensayo, las células diana (línea celular NCI-H929, Sigma, cat. núm.: 95050415) se marcaron con 2 μ M de colorante de proliferación eFluor670 (ThermoFisher Scientific, cat. núm.: 56-0048-82), preparado a 4×10^5 células/ml y 2×10^4 células (50
20 μ l) se sembraron en RPMI que contenía 2 % de L-glutamina y 2 % de penicilina/estreptomicina. Después de esta etapa, las PBMC se prepararon en suero 100 % humano (Sigma, cat. núm.: SLCD4040) y 200 unidades/ml de IL-2 (Roche, Proleukin) a 1×10^6 células/ml y 1×10^5 PBMC (100 μ l) se
25 sembraron alcanzando una relación efector-diana de 5:1. Después, diluciones seriadas de candidatos CD3/BCMA/CD38,

puntos de referencia (daratumumab, isatuximab (sec. con
núm. de ident.: 569 y sec. con núm. de ident.: 570),
83A10-TCBcv) o control (CD3/BCMA/CD38-085), comenzando
desde 80 nM para puntos de referencia anti-CD38 y 2 nM
5 para candidatos CD3/BCMA/CD38 y 83A10-TCBcv, después
diluidos por 10 o 5, respectivamente, se incubaron en el
cocultivo durante 48 h, a 37 °C, 5 % de CO₂.

Al final de la incubación, se evaluó la muerte
de células tumorales mediante citometría de flujo,
10 midiendo el recuento absoluto de células diana vivas
(células eFluor670⁺) y se calcula como % de muerte de la
diana = $[1 - (\text{recuentos absolutos de muestra}) / (\text{recuentos absolutos en presencia de células diana únicamente})] \times 100$. Se calculó la mitad de la concentración efectiva
15 máxima o EC₅₀ a partir de los valores de muerte diana
usando Prism (GraphPad). Se excluyeron algunos valores en
función de la bondad del ajuste ($R^2 > 0,7$), sobre el
porcentaje de muerte espontánea de células tumorales
(ventana de ensayo), valores de EC₅₀ fuera de rango y
20 porcentajes inadecuados de muerte (<20 %). Las curvas de
muerte de dianas finalmente se trazaron usando el
software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura
23A, así como EC₅₀ de muerte (Figura 23B) y el Área Bajo
la Curva (AUC) de una curva dosis-respuesta, determinada
25 para cada donante (Figura 23). Las medias de EC₅₀ (5-8
donantes) se compararon usando Kruskal-Wallis seguido de

la comparación post-hoc de Dunn y el AUC medio usando una prueba ANOVA unidireccional pareada seguida de la comparación post-hoc de Tukey. Se realizaron un total de tres experimentos independientes con cada candidato para un total de nueve donantes.

Resultados y conclusiones

CD3/BCMA/CD38-118 demostró una muerte estadísticamente significativamente superior de la línea celular de mieloma múltiple NCI-H929 en el ensayo de muerte de múltiples modos de acción en comparación con los puntos de referencia anti-CD38, daratumumab e isatuximab, como se muestra en la Figura 23A. Como se muestra en la Figura 23B, la muerte inducida por CD3/BCMA/CD38-118 (EC_{50} de $6,2 \pm 5,8$ pM) es significativamente mayor en comparación con la muerte provocada por daratumumab (EC_{50} de $94,5 \pm 19,8$ pM) e isatuximab (EC_{50} de $61,1 \pm 64,7$ pM). No se observaron diferencias significativas con otros tratamientos. Al calcular el AUC (Figura 23C), el candidato CD3/BCMA/CD38-118 desencadenó una muerte superior en comparación con los puntos de referencia anti-CD38, pero también en comparación con el candidato CD3/BCMA/CD38-119. Finalmente, el candidato CD3/BCMA/CD38-119 provocó una muerte significativamente superior en comparación con isatuximab.

Ejemplo 19: Eficacia de TREAT CD3/BCMA/CD38-118 y
CD3/BCMA/CD38-119 en un modelo de ratón tumoral NCI-H929
in vivo en comparación con el anticuerpo de referencia
5 83A10-TCBcv

Materiales y métodos

Crianza de animales

10 Los experimentos *in vivo* se realizaron en Crown
Bioscience Inc. (Beijing, China) en ratones hembras de 6-
7 semanas de edad NCG (NOD-*Prkdc*^{em2SCd52}//2rg^{em2SCd22}/NjuCrl)
de GemPharmatech Co., Ltd. Todos los ratones se
mantuvieron en condiciones ambientales estandarizadas y
15 se alojaron en jaulas IVC de polisulfona con lecho de
mazorcas de maíz trituradas esterilizadas en autoclave
(temperatura de 20-26 °C, humedad relativa del 40-70 %,
ciclo de luz/oscuridad de 12 horas). Los ratones
recibieron alimentos irradiados (pienso para roedor) y
20 0,22 µm de agua potable filtrada a voluntad. El bienestar
animal se controló diariamente (observaciones en la
jaula) y mediante observaciones clínicas semanales.

Modelo de ratón humanizado con tumor subcutáneo NCI-H929
25 y PBMC sistémicos

Se realizaron dos experimentos en Crown Bioscience Inc. (Beijing, China): Estudio 1 y Estudio 2.

Estudio 1. Aumento de la dosis de los candidatos TREAT CD3/BCMA/CD38 y 83A10-TCBcv en tumores NCI-H929. A los ratones hembra NCG se les injertó por vía subcutánea (sc) 1×10^7 células tumorales MM NCI-H929 e inoculadas intraperitonealmente (ip) con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante A y Donante B) el mismo día (9 ratones por grupo; 10 grupos; 2 donantes; 180 ratones en total). Los ratones fueron aleatorizados según el volumen del tumor 10 días después del xenoinjerto y se les inyectó por vía intravenosa (iv) el vehículo, las moléculas 83A10-TCBcv, CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg una vez por semana durante 3 semanas. El volumen del tumor se evaluó según la medición del tamaño del tumor con un calibrador tres veces por semana. Se recogió plasma de ratón el día 13 o 14 para determinar la concentración mínima de la molécula usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano (un método para cuantificar la IgG humana anti-BCMA, consulte la sección de ensayo ELISA del material y métodos). Este experimento se realizó solo una vez.

Estudio 2. Estudio farmacodinámico y de eficacia de TREAT CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 en tumores NCI-H929. A los ratones hembra NCG se les injertó sc con 1×10^7 células tumorales MM NCI-H929 e

inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante A y Donante B) el mismo día (15 ratones por grupo; 5 grupos; 2 donantes; 150 ratones en total). Los ratones fueron aleatorizados según el volumen del tumor 11 días después del xenoinjerto y se les inyectó por vía intravenosa vehículo, 83A10-TCBcv, moléculas CD3/BCMA/CD38-118, CD3/BCMA/CD38-119 y CD3/BCMA/CD38-122 a 0,1 mg/kg una vez por semana durante 3 semanas. La concentración mínima de la molécula se determinó en el plasma el día 14 usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano (consulte la sección de ensayo ELISA del material y métodos). El análisis ex vivo se realizó el día 2 y el día 6 después de una dosis única de moléculas (n = 2-3 ratones/grupo/punto de tiempo). Se recogieron suero, bazos y tumores de ratones. El análisis FACS se realizó en bazos y tumores. La detección de citocinas humanas se realizó con el ensayo Luminex en suero y sobrenadante tumoral. Este experimento se realizó solo una vez.

20

Ensayo ELISA

Las concentraciones plasmáticas de cada molécula se determinaron usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano. En resumen, una placa ELISA de 96 pocillos se recubre con proteína BCMA-His Tag humana (Acrobiosystems, Ref. BCA-H522y) a 2 µg/ml durante la noche

y los sitios no específicos se saturan con regulador de bloqueo al día siguiente. A continuación, se aplican las muestras de suero (que contienen candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv) y se incuban a temperatura ambiente (RT) durante 2 horas. Después de eliminar el anticuerpo no unido, se detecta el anticuerpo unido a BCMA usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Abeam, Ref. ab97225), incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la señal se genera a través de la acción de la enzima HRP sobre el sustrato TMB (tetrametilbencidina) y la absorbancia se lee en un espectrofotómetro usando 450 nm como longitud de onda primaria y 570 nm como longitud de onda de referencia. Los datos se analizaron usando Excel y GraphPad Prism 9.

Preparación de las muestras para citometría de flujo

Los tumores se recolectaron y se disociaron con un cóctel enzimático del kit de disociación de tumores humanos (Miltenyi Biotec, Ref. 130-095-929) en un disociador GentleMACS. Después, las suspensiones celulares se filtraron usando un colador de células de 70 μm y se centrifugaron. Se recuperó el sobrenadante del tumor (para el análisis de citocinas) y se resuspendió el sedimento celular, se contaron las células y se ajustaron a 10×10^7 células/ml en PBS suplementado con 10 % FCS y 40 mM EDTA

(regulador FACS). Los bazos se procesaron en el disociador GentleMACS (programa m_spleen_04) y la suspensión celular resultante se filtró a través de un colador de células de nailon de 70 μ M. A continuación, se lisaron los glóbulos rojos usando el regulador de lisis de glóbulos rojos (Beyotime, Ref. C3702), se contaron las células y se ajustaron a 10×10^7 células/ml en regulador FACS. Después se tiñeron suspensiones de tumores y bazo para determinar el perfil de células inmunes. En resumen, las suspensiones de células se incubaron con bloque Fc humano durante 10 minutos a 4 °C en regulador FACS, seguido de tinción de superficie con cóctel de anticuerpos (incluido colorante de viabilidad) durante 30 minutos a 4 °C en regulador FACS. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD y los datos se analizaron usando FlowJo v10.7.2 y GraphPad Prism 9.

Ensayo Luminex

Las muestras de suero y de sobrenadante tumoral se evaluaron mediante cuantificación con Luminex Multiplex de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, se añadieron perlas magnéticas, muestras, estándares y blancos a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se añadió el anticuerpo de detección a las placas y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, antes de

incubar con solución de estreptavidina-PE (30 min a temperatura ambiente). Después se lavaron las placas y se añadió el regulador de lectura antes de la adquisición con un instrumento Luminex LX200. Los datos de Luminex se analizaron usando el software Luminex 200™ para calcular curvas estándar usando el método de regresión de ajuste de curva logística 5P mediante un procedimiento automatizado y determinar las concentraciones de muestra (en µg/ml) a partir de la curva estándar. Después se usó el software Luminex xPONENT para generar un informe que incluía la concentración de cada pocillo y las curvas estándar, que se analizó más a fondo usando Excel y GraphPad Prism 9. La concentración de citocinas se normalizó al límite superior (ULOQ, por sus siglas en inglés) e inferior (LLOQ, por sus siglas en inglés) de cuantificación.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism 9. Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 9 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Resultados y conclusiones

Se evaluó la eficacia in vivo de los candidatos CD3/BCMA/CD38 en comparación con el anticuerpo de referencia biespecífico CD3×BCMA 83A10-TCBcv en varios niveles de dosis en un modelo de xenoinjerto tumoral NCI-H929 subcutáneo en ratones NCG en un entorno terapéutico. Células tumorales de mieloma humano NCI-H929 con altos niveles de expresión de BCMA (58×10^3 sABC: unidades de capacidad de unión a anticuerpos específicos) y CD38 (130×10^3 sABC) se inyectaron por vía subcutánea (sc) en ratones NCG (1×10^7 células). Paralelamente, se inyectaron PBMC humanos de 2 donantes humanos sanos A y B por vía intraperitoneal (ip) el mismo día (1×10^7 células). Los ratones fueron aleatorizados 10 días después de la inyección de células tumorales cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 150 mm^3 en varios grupos de tratamiento de PBMC inyectados del donante A ($n = 9$) y B ($n = 9$), se usaron dos donantes para tener en cuenta la variabilidad en la respuesta esperada con las PBMC. Los tratamientos terapéuticos de los candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv se inyectaron por vía intravenosa (iv) los días 0, 7 y 14 a 0,5, 0,1 o 0,02 mg/kg. A los ratones del grupo de control del vehículo se les inyectó por vía intravenosa una mezcla de PBS y regulador de reconstitución de candidatos CD3/BCMA/CD38.

Tres semanas después del inicio del tratamiento, CD3/BCMA/CD38-118 o -119 indujo la regresión completa de los tumores NCI-H929 a la dosis de 0,5 mg/kg para ambos donantes de PBMC, de forma similar al anticuerpo BCMA CD3
5 biespecífico 83A10-TCBcv (Figura 24A, izquierda). A un nivel de dosis de 0,1 mg/kg, mientras que los candidatos CD3/BCMA/CD38 y 83A10-TCBcv todavía inducen una regresión tumoral sustancial en ratones inoculados con el donante B (en el 100 % o el 77,7 % de los ratones tratados,
10 respectivamente), solo se pudo observar un control parcial de los tumores NCI-H929 en los ratones inoculados con el donante A (Figura 24A, medio). A esta dosis (0,1 mg/kg) en el donante A, CD3/BCMA/CD38-118 mostró una eficacia significativamente mayor en comparación con
15 83A10-TCBcv (Figura 24A, parte superior central; Tabla 27), con regresión tumoral observada en 5 de 9 ratones en los ratones tratados con CD3/BCMA/CD38-118, en comparación con 0 de 9 ratones en los ratones tratados con 83A10-TCBcv. El tratamiento de ratones NCG con una
20 dosis baja (0,02 mg/kg) de candidatos CD3/BCM A/CD38 o 83A10-TCBcv resultó en una inhibición débil pero estadísticamente significativa del crecimiento del tumor NCI-H929 en comparación con el control del vehículo, observado en mayor medida en los ratones inoculados con
25 el donante B (Figura 24A, derecha; Tabla 27). La mayoría de los ratones tratados con vehículo y dosis baja fueron

sacrificados entre los días 9 y 13 debido a la alta carga tumoral.

	Donante A				Donante B			
Comparación de grupos	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv	1413	1197 a 1629	****	<0,0001	1458	1317 a 1598	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv	683,1	467,4 a 898,9	****	<0,0001	1384	1244 a 1525	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv	117,5	-98,31 a 333,3	ns	0,7798	265,6	125,2 a 406,1	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	1433	1217 a 1649	****	<0,0001	1460	1319 a 1600	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	1187	971,2 a 1403	****	<0,0001	1469	1328 a 1609	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	241,9	26,06 a 457,6	*	0,0145	605,7	465,3 a 746,2	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	1434	1218 a 1650	****	<0,0001	1457	1317 a 1598	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	885,4	669,6 a 1101	****	<0,0001	1465	1324 a 1605	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	-125,8	-341,6 a 89,94	ns	0,7026	825,3	684,8 a 965,7	****	<0,0001
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv	-729,7	-945,5 a -513,9	****	<0,0001	-73,48	-213,9 a 66,97	ns	0,8176
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv	-1295	-1511 a -1080	****	<0,0001	-1192	-1333 a -1052	****	<0,0001
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-	20,16	-195,6 a 236,0	ns	>0,9999	2,039	-138,4 a 142,5	ns	>0,9999

118								
0,5 mg/kg de EM-801 vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-225,8	-441,6 a -10,02	*	0,0318	10,98	-129,5 a 151,4	ns	>0,9999
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-1171	-1387 a -955,2	****	<0,0001	-852,1	-992,6 a -711,7	****	<0,0001
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	21,08	-194,7 a 236,9	ns	>0,9999	0,4046	-140,9 a 140,1	ns	>0,9999
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	-527,4	-743,2 a -311,7	****	<0,0001	6,696	-133,8 a 147,2	ns	>0,9999
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	-1539	-1754 a -1323	****	<0,0001	-632,6	-773,0 a -492,1	****	<0,0001
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv	-565,7	-781,5 a -349,9	****	<0,0001	-1119	-1259 a -978,3	****	<0,0001
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	749,8	534,0 a 965,6	****	<0,0001	75,52	-64,94 a 216,0	ns	0,7921
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	503,9	288,1 a 719,6	****	<0,0001	84,46	-56,00 a 224,9	ns	0,6638
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-441,3	-657,1 a -225,5	****	<0,0001	-778,6	-919,1 a -638,2	****	<0,0001
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	750,7	535,0 a 966,5	****	<0,0001	73,08	-67,38 a 213,5	ns	0,8225
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg	202,2	-13,57 a 418,0	ns	0,0882	80,18	-60,28 a 220,6	ns	0,7282

de CD3/BCMA/CD38- 119								
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	-809	-1025 a -593,2	****	<0,0001	-559,1	-699,5 a -418,6	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118	1315	1100 a 1531	****	<0,0001	1194	1054 a 1335	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118	1070	853,7 a 1285	****	<0,0001	1203	1063 a 1344	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118	124,4	-91,41 a 340,2	ns	0,7168	340,1	199,6 a 480,5	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	1316	1101 a 1532	****	<0,0001	1192	1051 a 1332	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	767,9	552,1 a 983,7	****	<0,0001	1199	1058 a 1339	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	-243,3	-459,1 a -27,53	*	0,0135	559,6	419,2 a 700,1	****	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118	-246	-461,8 a -30,18	*	0,0117	8,938	-131,5 a 149,4	ns	>0,9999
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118	-1191	-1407 a -975,3	****	<0,0001	-854,2	-994,6 a -713,7	****	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-	0,9164	-214,9 a 216,7	ns	>0,9999	-2,443	-142,9 a 138,0	ns	>0,9999

119								
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	-547,6	-763,4 a -331,8	****	<0,0001	4,657	-135,8 a 145,1	ns	>0,9999
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	-1559	-1775 a -1343	****	<0,0001	-634,6	-775,1 a -494,2	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118	-945,1	-1161 a -729,4	****	<0,0001	-863,1	-1004 a -722,6	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	246,9	31,10 a 462,7	*	0,0112	-11,38	-151,8 a 129,1	ns	>0,9999
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	-301,6	-517,4 a -85,84	* * *	0,0004	-4,281	-144,7 a 136,2	ns	>0,9999
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	-1313	-1529 a -1097	****	<0,0001	-643,6	-784,0 a -503,1	****	<0,0001
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	1192	976,2 a 1408	****	<0,0001	851,7	711,3 a 992,2	* * * *	<0,0001
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	643,5	427,7 a 859,3	****	<0,0001	858,8	718,4 a 999,3	* * * *	<0,0001
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118 vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	-367,7	-583,5 a -151,9	****	<0,0001	219,5	79,09 a 360,0	* * * *	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	-548,5	-764,3 a -332,7	****	<0,0001	7,1	-133,4 a 147,6	ns	>0,9999

0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	-1560	-1776 a -1344	****	<0,0001	-632,2	-772,6 a -491,7	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	-1011	-1227 a -795,4	****	<0,0001	-639,3	-779,7 a -498,8	****	<0,0001

Tabla 27. Análisis estadístico de la Figura 24 (A). Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Tukey, $n = 9$ ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las concentraciones plasmáticas de los candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv se determinaron el día 13 o 14 antes de la tercera dosis usando un método ELISA desarrollado para cuantificar la IgG humana anti-BCMA. Los niveles plasmáticos a una dosis de 0,5 mg/kg de candidatos CD3/BCMA/CD38 se determinaron en alrededor de 3500 ng/ml, y 83A10-TCBcv mostró niveles similares con una concentración de alrededor de 2900 ng/ml (Figura 24B). La dosis de exposición de los candidatos CD3/BCMA/CD38 fue relativamente lineal entre dosis de 0,5 y 0,1 mg/kg, con concentraciones plasmáticas reducidas de 4 a 6 veces a 0,1 mg/kg (Figura 24B). La menor inhibición tumoral

observada en ratones inoculados con PBMC del donante A no se debió a menores concentraciones de anticuerpos plasmáticos a esta dosis (0,1 mg/kg), dado que las concentraciones mínimas fueron aproximadamente similares entre ambos ratones inoculados con PBMC del donante (Figura 24B). La dosificación de 0,02 mg/kg resultó en una exposición farmacocinética deficiente de los candidatos CD3/BCMA/CD38 en comparación con dosis más altas con concentraciones plasmáticas bajas, lo que indica que la disposición del fármaco mediada por la diana puede ser relevante en dosis más bajas.

En resumen, estos datos muestran que los candidatos CD3/BCMA/CD38 controlaron el crecimiento del tumor NCI-H929 de manera dependiente de la dosis cuando se usaron como tratamiento terapéutico en un modelo de xenoinjerto de mieloma humano en ratones NCG. En dosis de 0,1 mg/kg, CD3/BCMA/CD38-118 y -119 indujeron la regresión de tumores NCI-H929 establecidos en el 77 % y el 66 % de los ratones en un entorno terapéutico, respectivamente (conjunto de datos de los donantes A y B). En comparación, el tratamiento con 83A10-TCBcv a 0,1 mg/kg mostró una eficacia significativamente menor en el control de los tumores NCI-H929, observándose regresión solo en el 39 % de los tumores (conjunto de datos de los donantes A y B).

La eficacia in vivo de los candidatos CD3/BCMA/CD38 a 0,1 mg/kg se reevaluó en un experimento separado en el que se incluyó un control ficticio de CD3 (CD3/BCMA/CD38-122, sin los brazos de unión de CD38 y BCMA) (Figura 25). Se inyectaron células tumorales de mieloma humano NCI-H929 por vía subcutánea (sc) en ratones NCG (1×10^7 células) e inoculadas intraperitonealmente (ip) con PBMC humanas de 2 donantes humanos sanos A y B el mismo día (1×10^7 células). Los ratones fueron aleatorizados 11 días después de la inyección de células tumorales cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 180 mm^3 en varios grupos de tratamiento de PBMC inyectados del donante A ($n = 9$) y B ($n = 9$). Los tratamientos terapéuticos de los candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv se inyectaron por vía intravenosa (iv) los días 0, 7 y 14 a 0,1 mg/kg. A los ratones del grupo de control del vehículo se les inyectó por vía intravenosa una mezcla de PBS y regulador de reconstitución de candidatos CD3/BCMA/CD38.

Si bien una cinética de crecimiento tumoral más rápida (en comparación con el estudio anterior) condujo a una eficacia general menor, aún se observó un control parcial del tumor por NCI-H929 tras el tratamiento con candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv a 0,1 mg/kg (Figura 25A). Tres semanas después del inicio del tratamiento, tanto CD3/BCMA/CD38-118 como -119 retrasaron

sustancialmente la progresión de los tumores NCI-H929, en mayor medida en los ratones que recibieron PBMC de donante B (Figura 25A, derecha). El tratamiento con 83A10-TCBcv mostró un control tumoral NCI-H929

5 significativamente menor en comparación con CD3/BCMA/CD38-118 en ambos ratones inoculados con donantes de PBMC (Figura 25A, Tabla 28). Finalmente, la administración de CD3/BCMA/CD38-122 a 0,1 mg/kg no mostró control de la progresión del tumor NCI-H929 (similar a

10 los ratones tratados con vehículo) en ambos donantes de PBMC (Figura 25A). Esto último demuestra que los brazos de unión al antígeno diana son cruciales para la eficacia de muerte de tumores de los candidatos CD3/BCMA/CD38.

	Donante A				Donante B			
Comparación de grupos	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. 83A10-TCBcv	213,8	57,77 a 369,8	**	0,0019	665,5	510,3 a 820,8	****	<0,0001
Vehículo vs. CD3/BCMA/CD38-118	489,2	333,1 a 645,2	****	<0,0001	942,6	787,4 a 1098	****	<0,0001
Vehículo vs. CD3/BCMA/CD38-119	270,6	114,5 a 426,6	****	<0,0001	872,1	716,9 a 1027	****	<0,0001
Vehículo vs. CD3/BCMA/CD38-122	8,525	-147,5 a 164,6	ns	0,9999	37,46	-117,8 a 192,7	ns	0,9645
Comparación entre 83A10-TCBcv y CD3/BCMA/CD38-118	275,4	119,3 a 431,4	****	<0,0001	277	121,8 a 432,3	****	<0,0001
Comparación entre 83A10-TCBcv y CD3/BCMA/CD38-119	56,78	-99,26 a 212,8	ns	0,8566	206,6	51,37 a 361,8	**	0,0028

Comparación entre 83A10-TCBcv y CD3/BCMA/CD38-122	-205,3	-361,3 a -49,24	**	0,0032	-628,1	-783,3 a -472,9	****	<0,0001
CD3/BCMA/CD38-118 vs. CD3/BCMA/CD38-119	-218,6	-374,6 a -62,54	**	0,0013	-70,45	-225,7 a 84,78	ns	0,7257
CD3/BCMA/CD38-118 vs. CD3/BCMA/CD38-122	-480,7	-636,7 a -324,6	****	<0,0001	-905,1	-1060 a -749,9	****	<0,0001
CD3/BCMA/CD38-119 vs. CD3/BCMA/CD38-122	-262,1	-418,1 a -106,0	****	<0,0001	-834,7	-989,9 a -679,4	****	<0,0001

Tabla 28. Análisis estadístico de la Figura 25 (A). Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 9 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las concentraciones plasmáticas de los candidatos CD3/BCMA/CD38 fueron entre 1,7 y 1,9 veces superiores a los niveles plasmáticos de 83A10-TCBcv en la exposición mínima (día 14 antes de la tercera dosis) (Figura 25B). Por lo tanto, la eficacia superior de los candidatos CD3/BCMA/CD38 se correlacionó con concentraciones plasmáticas mínimas ligeramente mejores en comparación con el parámetro de referencia 83A10-TCBcv.

Para comprender la acción mecanística de los candidatos CD3/BCMA/CD38, se realizó un perfil de células inmunes (ICP) inmediatamente después del tratamiento (Figura 26). Los tumores y los bazos de los ratones se recolectaron el día 2 y el día 6 después de una dosis única de moléculas de 0,1 mg/kg y se realizó un análisis FACS (n = 2-3 ratones/grupo/punto temporal). El día 2 o el día 6 después de la dosificación, el tratamiento con CD3/BCMA/CD38-118, CD3/BCMA/CD38-119 o 83A10-TCBcv resultó en una infiltración selectiva de células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ humanas (marcador sustituto de las células T CD3) en el microambiente tumoral en comparación con los grupos tratados con control (Figura 26A). La extensión de la infiltración celular de $\text{TCR}\alpha\beta^+$ varió entre los donantes de PBMC; los ratones inoculados con el donante B, que mostró la mayor inhibición del crecimiento tumoral, también mostraron el mayor grado de infiltración de células T en el tumor (Figura 3A, parte inferior). El tratamiento con CD3/BCMA/CD38-122 no indujo una mayor presencia de células $\text{TCR}\alpha\beta^+$ en el tumor, lo que demuestra que la unión a CD3 por sí sola no es suficiente para aumentar la infiltración tumoral de células T. El día 6 después de la dosis única, la cantidad de células T infiltradas por gramo de tumor fue entre 35 y 50 veces mayor en los ratones tratados con los candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv, en comparación con los grupos tratados de control en ratones inoculados con el

donante B (Figura 26B). Estos datos mostraron que la
eficacia del activador de células T (candidatos
CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv) se correlaciona con el grado
de infiltración de células T dentro del microambiente
5 tumoral.

En comparación con los ratones tratados con
CD3/BCMA/CD38-122, las células T CD8+ infiltradas en el
tumor mostraron una mayor expresión de CD69 humano y CD25
humano (marcadores de activación de células T) en los
10 ratones tratados con candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv
el día 2 después de la dosis única (Figura 26C y Figura
26D, arriba). Sin embargo, las células T CD8+ encontradas
en la periferia (bazo) no tenían expresión de los
marcadores de activación CD69 y CD25 (Figura 3D, parte
15 inferior), por lo que no se observó evidencia de activación
no específica del tumor.

Finalmente, los datos FACS del perfil de células
inmunes se corroboraron con el análisis de citocinas en el
sobrenadante del tumor usando el ensayo Luminex (Figura
20 27). En consonancia con la activación de las células T
intratumorales, el IFN- γ y el TNF- α humanos fueron
inducidos específicamente en el tumor por los activadores
de células T poco después de la primera dosis (día 2), en
mayor medida en los ratones inoculados con el donante B
25 (Figura 27, arriba). También se detectaron específicamente
citocinas inflamatorias adicionales, como IL-1RA e IL-10

humanas, en el microambiente tumoral tras el tratamiento con candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv (Figura 27, parte inferior).

En conclusión, el grado de eficacia de los
5 candidatos CD3/BCMA/CD38 (0,1 mg/kg) en el control del tumor NCI-H929 se correlacionó con el grado de infiltración de células T dentro del microambiente tumoral. No se pudo observar evidencia de activación sistémica de células T 2 días después de la primera
10 dosis, lo que sugiere que la unión a la diana de las células que expresan BCMA/CD38 es necesaria para activar las células T in vivo. Estos datos in vivo demuestran que los candidatos CD3/BCMA/CD38 poseen un potente potencial citotóxico contra células tumorales con alta expresión de
15 CD38 y BCMA.

Ejemplo 20: Eficacia de TREAT CD3/BCMA/CD38-118 y

CD3/BCMA/CD38-119 en un modelo de ratón de tumor *in vivo*

BCMA^{bajo} CD38^{bajo} KMS-12-BM

20

Materiales y métodos

Crianza de animales

Los experimentos *in vivo* se realizaron en
25 hembras NSG inmunodeficientes de 6 a 8 semanas de edad (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) ratones de CHARLES RIVER

LABORATORIES Francia. Todos los ratones se mantuvieron bajo condiciones ambientales estandarizadas en jaulas de roedores (20 ± 1 °C de temperatura ambiente, 50 ± 10 % de humedad relativa, ciclo de luz-oscuridad de 12 horas). Los ratones recibieron alimentos y ropa de cama irradiados y agua potable filtrada a 0,22 pm. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos aprobados por las autoridades veterinarias del Cantón de Vaud, Suiza.

10

Modelo de ratón humanizado con tumor subcutáneo KSM-12-BM y PBMC sistémicos

Se realizaron dos experimentos y se denominaron, respectivamente, estudios KMS_10 y KMS_11.

15

Estudio KMS_10. Aumento de la dosis de los candidatos TREAT CD3/BCMA/CD38 en tumores KMS-12-BM. A los ratones hembra NSG se les injertó por vía subcutánea (sc) 1×10^7 células tumorales MM KMS-12-BM e inoculadas intraperitonealmente (ip) con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante C y Donante D) el mismo día (8 ratones por grupo; 10 grupos; 2 donantes; 160 ratones en total). Los ratones fueron aleatorizados según el volumen del tumor 8 días después del xenoinjerto y se les inyectó por vía intravenosa (iv) al día siguiente con vehículo, 83A10-TCBcv, moléculas CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg una vez por semana durante 3

20

25

semanas. El volumen del tumor se evaluó según la medición del tamaño del tumor con un calibrador tres veces por semana. Se recogió suero de ratón el día 23 o 30 para determinar la concentración mínima de la molécula usando un
5 ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano (un método para cuantificar la IgG humana anti-BCMA, consulte la sección de ensayo ELISA del material y métodos). Si los ratones alcanzaron un volumen tumoral de 1000 mm³ antes de finalizar el estudio se realizó la recolección de muestras
10 correspondientes ya sea antes de 3.^a dosis (día 23) o una semana después (día 30). Este experimento se realizó solo una vez.

Estudio KMS_11. Estudio farmacodinámico y de eficacia de TREAT CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119
15 en tumores KMS-12-BM. A los ratones hembra NSG se les injertó sc con 1×10^7 células tumorales MM KMS-12-BM e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de 2 donantes humanos sanos (Donante C y Donante D) el mismo día (14 ratones por grupo; 5 grupos; 2 donantes; 140 ratones en total).
20 Los ratones fueron aleatorizados según el volumen del tumor 8 días después del xenoinjerto y se les inyectó por vía intravenosa al día siguiente con vehículo, 83A10-TCBcv, moléculas CD3/BCMA/CD38-118, CD3/BCMA/CD38-119 y CD3/BCMA/CD38-122 a 0,5 mg/kg una vez por semana durante
25 3 semanas. El análisis ex vivo se realizó el día 2 y el día 6 después de una dosis única de moléculas (n = 2-3

ratones/grupo/punto temporal). Se recogieron suero, bazo y tumores de ratones. La concentración mínima de la molécula se determinó en suero el día 6 usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano (consulte la sección de ensayo ELISA del material y métodos). El análisis FACS se realizó en bazo y tumores. La detección de citocinas humanas se realizó con el ensayo Luminex en suero y sobrenadante tumoral. Este experimento se realizó solo una vez.

10

Ensayo ELISA

Las concentraciones séricas de cada molécula se determinaron usando un ELISA de captura de antígeno específico de BCMA humano. En resumen, la placa ELISA de 96 pocillos está recubierta con proteína BCMA-His Tag (producida internamente: P1658 -hsBCMA-ECD(Al-M54)-Avi-His) a 2 µg/ml durante la noche y los sitios no específicos se saturan con regulador de bloqueo al día siguiente. A continuación, se aplican las muestras de suero (que contienen candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv) y se incuban a temperatura ambiente (TA) durante 2 h. Después de eliminar el anticuerpo no unido, se detecta el anticuerpo unido a BCMA usando un fragmento Fc F(ab')₂ de IgG antihumana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch, Ref. 109-035-170), incubado a TA durante 1 h. Los pocillos se lavan entre

todas las etapas con solución salina regulada con fosfato (PBS) suplementada con 0,05 % de Tween 20 y la señal se genera a través de la acción de la enzima HRP sobre el sustrato TMB (tetrametilbencidina). Después la reacción se
5 detiene mediante la adición de 2N de solución de H₂SO₄ y la absorbancia leída en un espectrofotómetro usando 450 nm como longitud de onda primaria y 570 nm como longitud de onda de referencia. Los datos se analizaron usando Excel y GraphPad Prism 9.

10

Preparación de las muestras para citometría de flujo

Los tumores se recolectaron y se disociaron con un cóctel enzimático del kit de disociación de tumores humanos (Miltenyi Biotec, Ref. 130-095-929) en un
15 disociador GentleMACS. Después, las suspensiones celulares se filtraron usando un colador de células de 70 µm y se centrifugaron. Se recuperó el sobrenadante del tumor (para el análisis de citocinas) y se resuspendió el sedimento celular, se contaron las células y se ajustaron a 10×10^6
20 células/ml en PBS suplementado con 2 % FCS (regulador FACS). Las suspensiones celulares del bazo se obtuvieron machacándolas a través de un colador de nailon de 70 µm, se contaron las células y se resuspendieron en regulador FACS. Después se tiñeron suspensiones de tumores y bazo
25 para determinar el perfil de células inmunes. En resumen, las suspensiones de células se incubaron con colorante de

viabilidad, bloque Fc humano y de ratón durante 15 minutos a 4 °C en regulador FACS, seguido de tinción de superficie con cóctel de anticuerpos (o controles relativos) durante 30 minutos a 4 °C en regulador FACS. Las muestras se
5 adquirieron en el instrumento Northern Lights (CYTEK) y los datos se analizaron usando FlowJo v10.7.2 y GraphPad Prism 9.

Ensayo Luminex

10 Las muestras de suero y de sobrenadante tumoral se evaluaron mediante cuantificación con Luminex Multiplex de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron perlas magnéticas, muestras, estándares y espacios en blanco a las placas y
15 se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se añadió el anticuerpo de detección a las placas y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de incubar con solución de estreptavidina-PE (30 minutos a temperatura ambiente). Después se lavaron las placas y
20 se añadió el regulador de lectura antes de la adquisición con un instrumento Luminex LX200. Los datos de Luminex se analizaron usando el software ProcartaPlex Analyst 1.0. La concentración de citocinas se normalizó al límite superior (ULOQ, por sus siglas en inglés) e inferior
25 (LLOQ, por sus siglas en inglés) de cuantificación. Los datos se analizaron usando Excel y GraphPad Prism 9.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism 9. Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 8 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Resultados y conclusiones

Se evaluó la eficacia in vivo de los candidatos CD3/BCMA/CD38 en comparación con el anticuerpo de referencia biespecífico CD3xBCMA 83A10-TCBcv en varios niveles de dosis en un modelo de xenoinjerto tumoral KMS-12-BM subcutáneo en ratones NSG en un entorno terapéutico. Se inyectaron células tumorales de mieloma humano KMS-12-BM con niveles de expresión bajos/moderados de BCMA (9×10^3 sABC: unidades de capacidad de unión a anticuerpos específicos) y CD38 (27×10^3 sABC) por vía subcutánea (sc) en ratones NSG (1×10^7 células). Paralelamente, se inyectaron PBMC humanos de 2 donantes humanos sanos C y D por vía intraperitoneal (ip) el mismo día (1×10^7 células). Los ratones fueron aleatorizados 8

días después de la inyección de células tumorales cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 150 mm³ en varios grupos de tratamiento de PBMC inyectados del donante C (n = 8) y D (n = 8). Los tratamientos terapéuticos de los
5 candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv se inyectaron por vía intravenosa (iv) los días 9, 16 y 23 a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg. A los ratones del grupo de control del vehículo se les inyectó por vía intravenosa una mezcla de PBS y regulador de reconstitución de candidatos
10 CD3/BCMA/CD38.

Tres semanas después del inicio del tratamiento, CD3/BCMA/CD38-118 o -119 indujo la regresión completa de los tumores KMS-12-BM inoculados con PBMC C del donante en el 100 % de los ratones tratados a la dosis de 0,5 mg/kg,
15 similar al anticuerpo BCMA CD3 biespecífico 83A10-TCBcv, que condujo a la regresión del 87,5 % de los tumores (Figura 28A, arriba a la izquierda). A un nivel de dosis de 0,1 mg/kg, ambos candidatos CD3/BCMA/CD38 mostraron una eficacia significativamente mayor en comparación con 83A10-
20 TCBcv (Figura 28A, parte superior central; Tabla 29). El tratamiento de ratones NSG con una dosis baja de 0,02 mg/kg de candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv resultó en una inhibición débil pero estadísticamente significativa del crecimiento del tumor KMS-12-BM en comparación con el
25 control del vehículo (Figura 28A, arriba a la derecha; Tabla 29).

Tras la inoculación de PBMC de donantes D, las dosis máximas de candidatos CD3/BCMA/CD38 controlaron la progresión tumoral de manera similar a 83A10-TCBcv. Los candidatos CD3/BCMA/CD38 conducen a un control parcial de los tumores KMS-12-BM y se observa regresión tumoral en el 50 % de los ratones tratados con 0,5 mg/kg (Figura 28A, abajo a la izquierda). El tratamiento con candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv a 0,1 o 0,02 mg/kg no inhibió significativamente el crecimiento de tumores KMS-12-BM en ratones inoculados con PBMC del donante D (Figura 28A, parte inferior central y derecha; Tabla 29).

Comparación de grupos	Donante C				Donante D			
	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv	464,1	363,4 a 564,8	****	<0,0001	221,7	92,71 a 350,7	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv	326,8	222,9 a 430,8	****	<0,0001	76,32	-52,70 a 205,3	ns	0,6853
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv	198,8	98,11 a 299,4	****	<0,0001	4,482	-133,5 a 124,5	ns	>0,9999
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	534,2	433,6 a 634,9	****	<0,0001	262,6	133,6 a 391,6	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	500,6	400,0 a 601,3	****	<0,0001	104,8	-24,19 a 233,8	ns	0,2301
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	241	140,3 a 341,6	****	<0,0001	22,91	-151,9 a 106,1	ns	>0,9999
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	549,8	449,2 a 650,5	****	<0,0001	231,1	102,1 a 360,1	****	<0,0001

Vehículo vs. a 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	482,1	381,5 a 582,8	****	<0,0001	77,43	-51,59 a 206,4	ns	0,6668
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38- 119	158,9	58,24 a 259,6	****	<0,0001	23,98	-153,0 a 105,0	ns	0,9999
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de EM-801	137,3	-237,9 a -36,61	***	0,0007	145,4	-270,0 a -20,76	**	0,0086
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de EM-801	265,3	-362,6 a -168,1	****	<0,0001	226,2	-350,8 a -101,6	****	<0,0001
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118	70,14	-27,10 a 167,4	ns	0,3979	40,89	-83,75 a 165,5	ns	0,9897
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118	36,53	-60,72 a 133,8	ns	0,9736	116,9	-241,5 a 7,745	ns	0,0877
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 118	223,1	-320,4 a -125,9	****	<0,0001	244,6	-369,3 a -120,0	****	<0,0001
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	85,73	-11,52 a 183,0	ns	0,1392	9,382	-115,3 a 134,0	ns	>0,9999
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	18,03	-79,21 a 115,3	ns	0,9999	144,3	-268,9 a -19,65	**	0,0096
0,5 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38- 119	305,2	-402,4 a -208,0	****	<0,0001	245,7	-370,3 a -121,1	****	<0,0001
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de EM-801	128,1	-228,7 a -27,42	**	0,0024	-80,8	-205,4 a 43,84	ns	0,5593
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-	207,4	106,7 a 308,1	****	<0,0001	186,3	61,65 a 310,9	***	0,0001

118								
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	173,8	73,13 a 274,4	****	<0,0001	28,51	-96,14 a 153,1	ns	0,9994
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	85,88	-186,5 a 14,77	ns	0,1726	99,23	-223,9 a 25,41	ns	0,2564
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	223	122,3 a 323,6	****	<0,0001	154,8	30,14 a 279,4	**	0,0035
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	155,3	54,64 a 255,9	****	<0,0001	1,107	-123,5 a 125,7	ns	>0,9999
0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	167,9	-268,6 a -67,29	****	<0,0001	100,3	-224,9 a 24,34	ns	0,2424
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	335,5	238,2 a 432,7	****	<0,0001	267,1	142,5 a 391,7	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	301,9	204,6 a 399,1	****	<0,0001	109,3	-15,33 a 233,9	ns	0,1443
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	42,19	-55,05 a 139,4	ns	0,9343	18,43	-143,1 a 106,2	ns	>0,9999
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	351,1	253,8 a 448,3	****	<0,0001	235,6	110,9 a 360,2	****	<0,0001
0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	283,4	186,1 a 380,6	****	<0,0001	81,91	-42,73 a 206,5	ns	0,5391

0,02 mg/kg de 83A10-TCBcv vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-119	39,87	-137,1 a 57,37	ns	0,9536	-19,5	-144,1 a 105,1	ns	>0,9999
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	33,62	-130,9 a 63,63	ns	0,985	157,8	-282,4 a -33,15	**	0,0026
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	293,3	-390,5 a -196,0	****	<0,0001	285,5	-410,2 a -160,9	****	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	15,58	-81,66 a 112,8	ns	>0,9999	31,51	-156,2 a 93,13	ns	0,9986
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	52,11	-149,4 a 45,13	ns	0,7957	185,2	-309,8 a -60,55	***	0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	375,3	-472,6 a -278,1	****	<0,0001	286,6	-411,2 a -162,0	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	259,7	-356,9 a -162,4	****	<0,0001	127,7	-252,4 a -3,092	*	0,0394
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	49,2	-48,04 a 146,4	ns	0,8459	126,3	1,637 a 250,9	*	0,0441
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	18,49	-115,7 a 78,75	ns	0,9999	-27,4	-152,0 a 97,24	ns	0,9995
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	341,7	-439,0 a -244,5	****	<0,0001	128,8	-253,4 a -4,163	*	0,0362
0,02 mg/kg	308,9	211,6 a	****	<0,0001	254	129,4 a	****	<0,0001

CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119		406,1				378,7		
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	241,2	143,9 a 338,4	****	<0,0001	100,3	-24,31 a 225,0	ns	0,2419
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	82,06	-179,3 a 15,18	ns	0,1848	1,071	-125,7 a 123,6	ns	>0,9999
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119 vs. 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	67,69	-164,9 a 29,55	ns	0,4519	153,7	-278,3 a -29,04	**	0,0039
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	390,9	-488,2 a -293,7	****	<0,0001	255,1	-379,7 a -130,4	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119 vs. 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-119	323,2	-420,5 a -226,0	****	<0,0001	101,4	-226,0 a 23,24	ns	0,2284

Tabla 29. Análisis estadístico de la Figura 28 (A). Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron

mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con

- 5 prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 8 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

10 La menor inhibición tumoral observada en ratones inoculados con PBMC del donante D no se debió a

menores concentraciones de anticuerpos séricos, dado que las concentraciones mínimas fueron entre 1,2 y 1,9 veces mayores en comparación con los ratones inoculados con el donante C (Figura 28B). Los niveles séricos a una dosis de 0,5 mg/kg de candidatos CD3/BCMA/CD38 se determinaron el día 23 o 30 en alrededor de 3000 ng/ml (Figura 28B), de manera similar a los niveles de 83A10-TCBcv. La dosis de exposición de las moléculas candidatas CD3/BCMA/CD38 no fue lineal entre la dosis de 0,5 y 0,1 mg/kg con concentraciones séricas reducidas de 9 a 20 veces a 0,1 mg/kg una semana después de la 2.^a o 3.^a dosis (Figura 28B). La dosis de 0,02 mg/kg resultó en una exposición farmacocinética deficiente de los candidatos CD3/BCMA/CD38 en comparación con la dosis de 0,5 mg/kg con concentraciones séricas bajas de alrededor de 30 ng/ml.

En resumen, estos datos muestran que los candidatos CD3/BCMA/CD38 controlaron el crecimiento del tumor KMS-12-BM de manera dependiente de la dosis con una potencia de muerte superior al punto de referencia 83A10-TCBcv (un activador CD3xBCMA publicado, ref: Seckinger et al.) cuando se usa como tratamiento terapéutico en un modelo de xenoinjerto de mieloma humano en ratones NSG. En dosis de 0,5 mg/kg, los candidatos CD3/BCMA/CD38 indujeron una regresión completa de los tumores KMS-12-BM

establecidos en el 62,5 % de los ratones en un entorno terapéutico (conjunto de datos de los donantes C y D).

La eficacia in vivo de los candidatos CD3/BCMA/CD38 a 0,5 mg/kg se reevaluó en un experimento
5 separado en el que se incluyó un control ficticio de CD3 (CD3/BCMA/CD38-122, sin los brazos de unión de CD38 y BCMA) (Figura 29). Las células tumorales de mieloma humano KMS-12-BM se inyectaron por vía subcutánea (sc) en ratones NSG (1×10^7 células) e inoculadas
10 intraperitonealmente (ip) con PBMC humanas de 2 donantes humanos sanos C y D el mismo día (1×10^7 células). Los ratones fueron aleatorizados 8 días después de la inoculación de células tumorales.

inyección cuando el volumen tumoral promedio
15 alcanzó 120 mm^3 en varios grupos de tratamiento de PBMC inyectados del donante C ($n = 8$) y D ($n = 8$). Los tratamientos terapéuticos de los candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv se inyectaron por vía intravenosa (iv) los días 0, 7 y 14 a 0,5 mg/kg. A los ratones del grupo de control
20 del vehículo se les inyectó por vía intravenosa una mezcla de PBS y regulador de reconstitución de candidatos CD3/BCMA/CD38.

Como se observó previamente, tres semanas después del inicio del tratamiento, CD3/BCMA/CD38-118 y -119
25 indujeron la regresión completa de los tumores KMS-12-BM inoculados con PBMC C del donante en el 100 % y el 87,5 %

de los ratones tratados, respectivamente. De manera similar, el anticuerpo BCMA CD3 biespecífico 83A10-TCBcv condujo a la regresión del 75 % de los tumores (Figura 28A, izquierda). Tras la inoculación de PBMC de donantes D, los
5 candidatos CD3/BCMA/CD38 controlaron parcialmente los tumores KMS-12-BM, y se observó una regresión tumoral en el 37,5 a 50 % de los ratones tratados. El tratamiento con 83A10-TCBcv indujo una regresión tumoral significativamente menor (25 % de los ratones tratados) (Figura 28A, derecha;
10 Tabla 30). Finalmente, la administración de CD3/BCMA/CD38-122 a 0,5 mg/kg no mostró ningún control de la progresión del tumor KMS-12-BM (similar a los ratones tratados con vehículo) en ambos donantes de PBMC (Figura 28A), lo que demuestra que los brazos de unión del antígeno diana son
15 cruciales para la eficacia de muerte del tumor de los candidatos CD3/BCMA/CD38.

Las concentraciones séricas de los candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv se determinaron el día 6 en alrededor de 2000 ng/ml (donante C) y alrededor de
20 3000 ng/ml (donante D) en niveles similares en todos los grupos de tratamiento (Figura 28B). Por lo tanto, los candidatos CD3/BCMA/CD38 superan a 83A10-TCBcv en el control de tumores KMS-12-BM (donante D), a pesar de tener exposiciones mínimas similares.

	Donante C				Donante D			
Comparación de grupos	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif. (mm ³)	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. 83A10-TCBcv	462,3	408,4 a 516,3	****	<0,0001	148,6	35,54 a 261,6	**	0,0033
Vehículo vs. CD3/BCMA/CD38-118	482,6	428,7 a 536,5	****	<0,0001	271,2	158,2 a 384,3	****	<0,0001
Vehículo vs. CD3/BCMA/CD38-119	439	385,1 a 492,9	****	<0,0001	363,7	250,7 a 476,8	****	<0,0001
Vehículo vs. CD3/BCMA/CD38-122	3,498	-50,44 a 57,43	ns	0,9998	33,49	-79,56 a 146,5	ns	0,927
Comparación entre 83A10-TCBcv y CD3/BCMA/CD38-118	20,28	-33,66 a 74,22	ns	0,8413	122,7	9,613 a 235,7	*	0,0258
Comparación entre 83A10-TCBcv y CD3/BCMA/CD38-119	-23,33	-77,27 a 30,61	ns	0,76	215,2	102,1 a 328,2	****	<0,0001
Comparación entre 83A10-TCBcv y CD3/BCMA/CD38-122	-458,8	-512,8 a -404,9	****	<0,0001	-115,1	-228,1 a -2,045	*	0,0437
Comparación entre CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119	-43,61	-97,55 a 10,33	ns	0,1761	92,5	-20,55 a 205,5	ns	0,1665
CD3/BCMA/CD38-118 vs. CD3/BCMA/CD38-122	-479,1	-533,0 a -425,2	****	<0,0001	-237,8	-350,8 a -124,7	****	<0,0001
CD3/BCMA/CD38-119 vs. CD3/BCMA/CD38-122	-435,5	-489,4 a -381,6	****	<0,0001	-330,3	-443,3 a -217,2	****	<0,0001

Tabla 30. Análisis estadístico de la Figura 29 (A). Las

diferencias en el volumen del tumor se determinaron

mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con

5 prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 8 ratones por

grupo. Un valor p < 0,05 se consideró estadísticamente

significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para comprender la acción mecanística de los
5 candidatos CD3/BCMA/CD38, se realizó un perfil de células
inmunes (ICP) inmediatamente después del tratamiento
(Figura 30). Los tumores y los bazos de los ratones se
recolectaron el día 2 y el día 6 después de una dosis única
de moléculas de 0,5 mg/kg y se realizó un análisis FACS (n
10 = 2-3 ratones/grupo/momento). Ya sea el día 2 o el día 6
después de la dosificación, el tratamiento con
CD3/BCMA/CD38-118, CD3/BCMA/CD38-119 o 83A10-TCBcv resultó
en una infiltración selectiva de células TCRaP+ humanas
(marcador sustituto de células T CD3) en el microambiente
15 tumoral en comparación con los grupos tratados con vehículo
o CD3/BCMA/CD38-122 (Figura 30A). El grado de infiltración
de células TCRaP+ varió entre los donantes de PBMC; los
ratones inoculados con el donante C, que mostró la mayor
inhibición del crecimiento tumoral, también mostraron el
20 mayor grado de infiltración de células T en el tumor
(Figura 30A, arriba). El tratamiento con CD3/BCMA/CD38-122
no indujo una mayor presencia de células TCRaP+ en el
tumor, lo que demuestra que la unión a CD3 por sí sola no
es suficiente para aumentar la infiltración tumoral de
25 células T. La cantidad de células T infiltradas por gramo
de tumor también aumentó en los ratones inoculados con

donante C tras el tratamiento con candidatos CD3/BCMA/CD38 (aumento de 20 y 100 veces en comparación con los grupos tratados de control en los días 2 y 6, respectivamente) (Figura 30B). Estos datos mostraron que la eficacia de los
5 activadores de células T (candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv) se correlaciona con el grado de infiltración de células T dentro del microambiente tumoral.

El día 2 después de la dosis única, las células T CD8⁺ infiltradas en el tumor mostraron una mayor
10 expresión de CD69 humano y CD25 humano (marcadores de activación de células T) en ratones tratados con candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv, en comparación con los grupos tratados con vehículo o CD3/BCMA/CD38-122 (Figura 30C y Figura 30D, arriba). La activación de
15 células T intratumorales se observó principalmente en ratones inoculados con PBMC C de donantes, lo que demuestra que la eficacia del tratamiento de los candidatos CD3/BCMA/CD38 también se correlaciona con un mayor estado de activación de células T dentro del tumor.
20 Además, las células T CD8⁺ encontradas en la periferia (bazo) el día 2 mostraron poca o ninguna expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 (Figura 30D, parte inferior), por lo que no se observó evidencia de activación sistémica de células T.

25 Finalmente, los datos FACS del perfil de células inmunes se corroboraron con el análisis de citocinas en el

sobrenadante del tumor usando el ensayo Luminex (Figura 31). En consonancia con la activación de las células T intratumorales, el IFN- γ y el TNF- α humanos fueron inducidos específicamente en el tumor por los activadores de células T tanto el día 2 como el 6 después de la primera dosis, en mayor medida en los ratones inoculados con el donante C (Figura 31, arriba). Además, la perforina y las granzimas (moléculas citotóxicas) también estaban elevadas en el tumor el día 6, especialmente en los ratones inoculados con PBMC C del donante (Figura 31, medio e inferior). Estos datos indican que los candidatos CD3/BCMA/CD38 o 83A10-TCBcv inducen sustancialmente la secreción de citocinas citotóxicas humanas en el microambiente tumoral.

En conclusión, el grado de eficacia de los candidatos CD3/BCMA/CD38 (0,5 mg/kg) en el control del tumor KMS-12-BM se correlacionó con el grado de infiltración de células T y el estado de activación dentro del microambiente tumoral. No se pudo observar evidencia de activación sistémica de células T 2 días después de la primera dosis, lo que sugiere que la unión a la diana con las células que expresan BCMA/CD38 es necesaria para activar las células T in vivo. Estos datos in vivo demuestran que los candidatos CD3/BCMA/CD38 poseen un potente potencial citotóxico contra células tumorales con baja expresión de CD38 y BCMA.

Ejemplo 21: PK de CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119
en ratones TG32/SCID

5 Materiales y métodos

Ganadería y toma de muestras de sangre

Los experimentos *in vivo* se realizaron en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, EE. UU.) de acuerdo con los protocolos JAX IACUC. TG32/SCID se refiere a B6.Cg-FcgrttmlDcr Prkdcscid Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ (Tg32 SCID, JAX stock# 018441.

Ensayo ELISA

15 Se recogieron muestras de sangre de 25 µL de cada ratón de acuerdo con el cronograma de sangrado que se muestra en la siguiente tabla a los 5 min, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 10 d, 14 d, 17 d, 21 d, 24 d y 28 d. Las muestras de sangre se recogieron en 1 µl de K₃EDTA, procesado en plasma, diluido 1/10 en glicerol al 50 % en PBS, transferido a placas de almacenamiento especializadas de 96 pocillos y almacenado a -20 °C. Todas las muestras de plasma se evaluaron mediante ELISA Mabtech (3850-1AD-6) hlgG Fc para cuantificar la actividad de Fc de IgG humana.

20

25

Cálculos de PK

Todos los cálculos farmacocinéticos se realizaron usando Phoenix WinNonLin (Certara, EE. UU.). El análisis estadístico y la elaboración de gráficos se realizaron usando el software GraphPad Prism 9.

Resultados y conclusiones

Se evaluó la farmacocinética in vivo de CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 en ratones TG32/SCID que expresan receptores Fc neonatales humanos (FcRn). Se recogieron muestras de sangre durante 4 semanas y se analizaron para determinar la concentración de TREAT. Ambos TREATS tenían perfiles farmacocinéticos similares, con una distribución y eliminación (ver Figura 32) ampliamente comparables. Cuando se calcularon los parámetros farmacocinéticos, ambos tenían vidas medias de eliminación superiores a una semana en este modelo (Tabla 31). Con base en estos datos, ambos TREATS interactúan con el FcRn humano para brindar vidas medias de eliminación que respaldan la dosificación semanal.

20

Molécula	Vida media (días)	C _{máx} (µg/ml)	AUC (µg.días/ml)
CD3/BCMA/CD38-118	7,6 ± 0,9	95 ± 26	417 ± 75
CD3/BCMA/CD38-119	8,3 ± 1,7	132 ± 26	529 ± 79

Tabla 31. Parámetros farmacocinéticos de CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 en ratones SCID TG32. A ratones SCID TG32 se les inyectó por vía intravenosa una dosis

única de CD3/BCMA/CD38-118 y CD3/BCMA/CD38-119 a 5 mg/kg y se evaluó el plasma para determinar la concentración de TREAT. Los parámetros farmacocinéticos se informan como media +/- DE de 6 ratones.

5

Ejemplo 22: Caracterización adicional de los anticuerpos CD3/BCMA/CD38

Ejemplo 22 (a): Expresión y caracterización de moléculas de control adicionales para la caracterización de los TREAT CD3/BCMA/CD38

10

Materiales y métodos

Expresión y purificación de alnuctamab (lote pALB205 y P2078)

15

Para el lote pALB205 de alnuctamab (DCI recomendada: Lista 85; El sobrenadante filtrado y acondicionado obtenido como se detalla en el ejemplo 3 (OMS, Información sobre medicamentos, vol. 35, n.º 1, 2021) se incubó con resina mAbSelectSURE (Cytiva Life Sciences) durante la noche a 4 °C con agitación. Después de la incubación, las proteínas unidas se lavaron con 10 volúmenes de columna (CV) de PBS pH 7.4, seguidos por elución en 100 mM de glicina pH 3.0. El eluato resultante se purificó aún más mediante cromatografía de intercambio

20

25

cati3nico. La columna HiTrap HP SP (volumen de lecho de 1 ml) se preequilibr3 en un regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.5 y se oper3 en un sistema de cromatograf3a AKTA pure™ (columna e instrumento de Cytiva Life Sciences) a un caudal de 1 ml/min. El eluato de prote3na A se diluy3 en acetato de sodio 50 mM, pH 5.5 antes de la inyecci3n en la columna. Posteriormente se realiz3 la eluci3n usando un gradiente lineal de 0 a 250 mM de NaCl en acetato de sodio 50 mM, pH 5.5 sobre 30 CV. Las fracciones seleccionadas del eluato de intercambio cati3nico correspondiente a alnuctamab seg3n lo evaluado por SDS-PAGE se agruparon y se purificaron a3n m3s mediante cromatograf3a de exclusi3n por tama3o en una columna HiLoad Superdex 200 16-60 PrepGrade operada en PBS, pH 7.4 en un sistema de cromatograf3a FKTA pure™ (columna e instrumento de Cytiva Life Sciences). Las fracciones correspondientes al pico principal se agruparon y analizaron como se describi3 previamente para otros constructos de anticuerpos recombinantes.

Para el lote P2078 de alnuctamab (DCI recomendada: Lista 85; Informaci3n sobre medicamentos de la OMS, vol. 35, n.º 1, 2021), se a3adieron perlas magn3ticas de prote3na A (perlas magn3ticas de prote3na A de GenScript) al cultivo un d3a antes de la cosecha y se incubaron durante la noche a 32 °C con agitaci3n adecuada. Las perlas se recogieron usando una varilla magn3tica

(AmMag™ Wand Sleeve D12) y se colocaron en un soporte de separación magnética. Las perlas se lavaron primero en PBS 1X, pH 7.4 hasta eliminar todos los restos celulares visibles y las proteínas se eluyeron con un protocolo de elución por etapas, usando secuencialmente acetato de sodio 50 mM, pH 4.1. El eluido de PA se neutralizó añadiendo 5 % (v/v) de IM Tris-HCl, pH 8.0 y se purificó aún más mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEX, por sus siglas en inglés). Se usó una secuencia de cromatografía de dos etapas. En una primera etapa se usó una columna de desalinización (HiPrep 26/10 desalinizadora, Cytiva) para el intercambio de regulador. Después de equilibrar la columna de desalinización con un regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.5, se inyectaron anticuerpos purificados en la columna. Después, se usó el monitoreo automatizado de la señal UV junto con el uso de la válvula versátil V9H-V para inyectar específicamente anticuerpos a una columna de cromatografía de intercambio catiónico Hitrap HP SP (volumen de lecho de 5 ml, Cytiva). Después de la carga completa de la muestra, se realizó la cromatografía CEX usando un gradiente lineal de 0 a 300 mM de NaCl en acetato de sodio 50 mM, pH 5.5 sobre 40 CV. Las fracciones recogidas se analizaron por SE-HPLC y se seleccionaron basado en la pureza aparente. Después se agruparon las fracciones de interés y se intercambiaron el regulador en 5 mM de histidina, 4 % de sacarosa (p/v), pH 6.0 y 0,01 %

de Tween 80 (v/v). Los anticuerpos purificados se almacenaron a -80 °C después de la filtración estéril en un filtro de 0,2 µm.

5 Producción de Teclistamab (lote pALB203 y P2095)
purificación

Teclistamab (DCI recomendada: La lista 82, Información sobre medicamentos de la OMS, vol. 33, n.º 3, 2019) se expresó como dos anticuerpos monoclonales
10 separados que se unen a BCMA o CD3 y se reconstituyó posteriormente como se describió anteriormente (Labriijn et al., Nat. Prot., 2014, 9(10):2450-63). Después de la reconstitución del anticuerpo biespecífico, este se purificó aún más, se transfirió a reguladores apropiados
15 y se caracterizó como se describe en el Ejemplo 3 para todas las demás construcciones basadas en anticuerpos.

Moléculas de control adicionales en la purificación del
formato TREAT

20 Las moléculas de control descritas en este ejemplo se produjeron de acuerdo con el protocolo detallado en el Ejemplo 3. Además se probaron moléculas de control de acuerdo con las combinaciones de secuencias detalladas en la Tabla 32. Aquí se usó un aglutinante
25 irrelevante, denominado G6DU, en lugar de los brazos de unión CD3, BCMA o CD38 o en lugar de cualquier

combinación de dos brazos de unión como se detalla en la Tabla 33. Otros controles incluyeron anticuerpos biespecíficos dirigidos a BCMA y CD3 pero no a CD38 con dos aglutinantes BCMA diferentes usados en anticuerpos triespecíficos. Todos estos controles adicionales fueron dializados a histidina, 25 mM, 150 mM NaCl, pH 6.0.

CD3/BCMA/CD38_	Cadena 1	Cadena 2	Cadena 3
147	Sec. con núm. de ident.: 548	Sec. con núm. de ident.: 553	Sec. con núm. de ident.: 1
149	Sec. con núm. de ident.: 546	Sec. con núm. de ident.: 555	Sec. con núm. de ident.: 1
150	Sec. con núm. de ident.: 548	Sec. con núm. de ident.: 555	Sec. con núm. de ident.: 1
151	Sec. con núm. de ident.: 528	Sec. con núm. de ident.: 547	Sec. con núm. de ident.: 1
156	Sec. con núm. de ident.: 548	Sec. con núm. de ident.: 529	Sec. con núm. de ident.: 1
157	Sec. con núm. de ident.: 546	Sec. con núm. de ident.: 529	Sec. con núm. de ident.: 1
158	Sec. con núm. de ident.: 528	Sec. con núm. de ident.: 553	Sec. con núm. de ident.: 1

Tabla 32: Sec. con núm. de ident. de anticuerpos control

CD3/BCMA/CD38.

Resultados y conclusiones

Producción y caracterización de alnuctamab y teclistamab

Alnuctamab es un biespecífico CD3xBCMA en formato 2+1, basado en un Fc con mutaciones L234A/L235A/P329G (numeración de UE). Alnuctamab se produjo en células CHO con ADN plasmídico que codifica las cuatro cadenas

identificadas en la Lista de nomenclatura no propietaria internacional (DCI recomendada: Lista 85; Información sobre medicamentos de la OMS, vol. 35, núm. 1, 2021). Después de tres etapas de purificación por proteína A, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño (solo para el lote pALB205), el lote pALB205 y el lote P2078 de alnuctamab tuvieron una pureza del 94,6 % y 96,43 %, respectivamente, según se determinó mediante SE-HPLC.

Teclistamab es un biespecífico CD3×BCMA basado en el Fc IgG4-F234A/L235A/S228P (numeración de UE) y se produjo primero como dos mAb separados en células CHO con ADN plasmídico que codifica las cadenas pesadas y ligeras del brazo de unión a BCMA y CD3, respectivamente, e identificado en la Lista de nomenclatura internacional no propietaria (DCI recomendada: Lista 82, Información sobre medicamentos de la OMS, vol. 33, núm. 3, 2019). El anticuerpo biespecífico se reconstituyó como se describió previamente (Labrijn et al., Nat. Prot., 2014,9(10):2450-63) después de la purificación de la proteína A. Después de una etapa de purificación posterior mediante cromatografía de intercambio catiónico, el lote pALB203 y el lote P2095 de teclistamab tuvieron una pureza del 98,8 % y 99,51 %, según se determinó mediante SE-HPLC.

Producción y caracterización de moléculas de control

adicionales para la caracterización de CD3/BCMA/CD38 TREATS

Se diseñaron y produjeron con éxito anticuerpos de control adicionales en el formato TREAT de acuerdo con la Tabla 32 en células CHO-S y mostraron porcentajes de pico principal en SE-HPLC que variaron entre 95,90 y 99,22 % después de la purificación (Tabla 33). Otros controles usados en este ejemplo se han descrito en el Ejemplo 12.

10

CD3/BCMA/CD38-	147	149	150	151	156	157	158
IDENTIFICACIÓN DEL LOTE	P1936	pTHM145	pTHM146	pARE312	pTHM147	pTHM148	pTHM149
Aglutinante CD3 o ficticio	G6DU	C1-D6	C1-D6	C1-D6	G6DU	G6DU	G6DU
Aglutinante CD38 o ficticio	B3	B3-C11	B3	G6DU	B3	B3-C11	G6DU
Aglutinante BCMA o ficticio	E6-G6-N82aS	G6DU	G6DU	E6-G6-N82aS	G6DU	G6DU	E6-G6-N82aS
rendimiento (mg/L)	26	27,2	47,3	24,5	57,8	44,1	52,2
Pureza final (% de monómero)	98,91	97,15	98,18	99,22	98,2	96,89	95,90

Tabla 33: Descripción y caracterización de moléculas de control usadas para caracterizar las moléculas CD3/BCMA/CD38.

15 Todos los controles adicionales se consideraron de calidad adecuada para su uso posterior en la caracterización in vitro de anticuerpos CD3/BCMA/CD38.

Ejemplo 22 (b): Las líneas celulares de mieloma múltiple expresan diversos niveles de CD38 y BCMA

Material y métodos

5

Generación de grupos de células NCI-H929 knockout (KO) de BCMA y CD38

Las líneas celulares NCI-H929 BCMA KO y CD38 KO se derivaron de las células NCI-H929 originales (95050415, lote 17A027, Sigma de ECACC) al apuntar al primer exón del gen BCMA o del gen CD38 usando tecnología de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR)/Cas9, como lo describieron Ran et al. [Ran et al., 2013, Cell, 154: 1380-1389], La línea celular NCI-H929 se transfectó usando 4D-Nucleofector (Lonza) siguiendo la recomendación del fabricante. Después de la transfección, las células se tiñeron con anticuerpo anti-BCMA (269-020, Ancell) o anticuerpo CD38 (12-0389-42, clon HIT2, eBioscience) y las células knock-out se clasificaron usando el clasificador Melody FACS (BD) para generar un grupo de células knock-out. La falta de expresión de BCMA o CD38 se verificó además mediante citometría de flujo usando Qifikit (DAKO, cat. núm.: K007811-8) y análisis de puntos de interrupción de mapeo usando clonación TA y secuenciación Sanger y software de análisis ICE-Synthego.

Caracterización de líneas celulares de mieloma múltiple y células T primarias mediante un ensayo de capacidad de unión de anticuerpos específicos

5 Los niveles de expresión de CD38 humano y BCMA humano en la superficie celular se determinaron usando citometría de flujo QIFIKIT (DAKO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método permite la cuantificación de sitios antigénicos en la superficie
10 celular al proporcionar un valor de unión de anticuerpos por célula. Se usaron anticuerpos primarios de ratón anti-CD38 humano (clon HIT2), anti-BCMA humano (clon ANC3B1) e inmunoglobulina (Ig) G1 de isotipo de ratón en las líneas celulares KMS-12-BM, MOLP-8, NCI-H929, NCI-
15 H929 CD38 KO y NCI-H929 BCMA KO. Cien mil células por pocillo se tiñeron con anticuerpos primarios a concentración saturante y después de la incubación y los lavados, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-Ig-FITC de ratón, a una concentración saturante, así como
20 las perlas para la curva de calibración. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (Cytoflex) y los datos se analizaron con el software de citometría de flujo (CytExpert) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25

Resultados y conclusiones

La expresión de BCMA y CD38 en las líneas de células cancerosas evaluadas estuvo de acuerdo con los datos publicados que muestran que las células de mieloma expresan BCMA así como CD38 como lo describen Uhlen et al [Uhlen et al., 2017, Science, 357(6352):eaan2507]. Los niveles de CD38 y BCMA para KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929 fueron consistentes en todos los experimentos. Las células NCI-H929 CD38 KO expresan BCMA (51×10^3 sABC) pero no expresan CD38. Las células NCI H929 BCMA KO expresan CD38 (26×10^3 sABC) y no expresan niveles detectables de BCMA. También se determinó la expresión relativa de CD3 y CD38 en células T humanas primarias aisladas que expresaron altos niveles de CD3 (67×10^3 sABC), niveles bajos de CD38 ($1,8 \times 10^3$ sABC) y no hay niveles detectables de BCMA.

La media y la desviación estándar de los valores de sABC para cada línea celular se resumen en la Tabla 34.

Línea celular	Media de CD38 sABC $\pm$ DE 10^3	Media de BCMA sABC $\pm$ DE 10^3	Media de CD3 sABC $\pm$ DE 10^3	Nomenclatura por ejemplo
KMS-12-BM	28 ± 2	$9 \pm 0,2$	No aplicable	BCMA+CD38+
NCI-H929	85 ± 19	52 ± 13	No aplicable	BCMA++CD38++
MOLP-8	512 ± 184	$3,2 \pm 0,4$	No aplicable	BCMAIowCD38+++
NCI-H929 BCMA KO	26 ± 4	BLQ	No aplicable	BCMA-CD38++
NCI-H929 CD38 KO	BLQ	51 ± 12	No aplicable	BCMA++CD38-
células T humanas	$1,8 \pm 0,7$	No aplicable	$66,9 \pm 4,3$	No aplicable

Tabla 34: Todas las líneas celulares y células T primarias expresan niveles de CD38 y BCMA alineados con la literatura. La tabla muestra los valores de sABC determinados mediante experimentos de citometría de flujo.

- 5 Cada valor es la media +/- desviación estándar de tres a seis mediciones de tres experimentos independientes. BLQ significa Por debajo del límite de cuantificación, DE, para desviación estándar, MM, para mieloma múltiple. No aplicable significa que no ha sido medido.

10

Ejemplo 22 (c): Los marcadores de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA se unen a las células T humanas primarias CD38-negativas

- 15 Material y métodos

Unión a células T primarias humanas

- Se recolectaron PMBC humanas a partir de capas hinchadas obtenidas del Centro de Transfusión de La Chaux-de-Fonds (Suiza) usando aislamiento de gradiente de densidad de Ficoll. Las células T se aislaron (StemCell Technologies, 17951) de PBMC y se congelaron en medio de congelación de células CryoStor10 (StemCell, núm. 07930). Las células se descongelaron en medio RPMI completo
- 20
- 25 precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de

aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante la noche a $1,5 \times 10^6$ células/ml. Las células se sembraron a razón de 1×10^5 células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Las placas se centrifugaron a 350 g durante 3 minutos a 4 °C y las células se lavaron dos veces con DPBS. Las células se resuspendieron en 25 µl de LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain (ThermoFisher Scientific, L34976) diluido a 1/1'000 en DPBS e incubado 20 minutos a 4 °C. Después de dos lavados en regulador FACS con azida, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS frío que contenía diluciones seriadas de CD3/BCMA/CD38-118, puntos de referencia (83A10-TCBcv, alnuctamab, teclistamab) y anticuerpos de control (CD3/BCMA/CD38-85 (control negativo irrelevante TREAT)) a partir de 800 nM y diluidos por 3. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C, después se lavaron dos veces con regulador FACS a 350 g durante 3 min, se resuspendieron en 50 µl de un cóctel de anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG humana PE (Biolegend, 366904) y anticuerpos de co-tinción para CD38 humano (Anti-CD38 FITC multi-epítipo, Cytognos, CYT-38F2) diluidos respectivamente 1/50 y 1/10 en regulador FACS e incubados 20 min a 4 °C. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 25 µl de regulador FACS con azida. Las muestras se adquirieron en un instrumento iQue Screener Plus (IntelliCyt). Las células se

clasificaron basadas en el tamaño de FSC vs SSC y se excluyeron los restos, los dobletes y las células muertas. Finalmente, las células viables fueron seleccionadas para las células CD38-T. La población se analizó para la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI) de PE usando el software iQue Forecyt[®]. En las etapas posteriores del análisis solo se consideraron las muestras que mostraban al menos 2000 células en la puerta final. La intensidad de fluorescencia media geométrica relativa (RFI) se calculó por donante restando la media de la MFI del control negativo de la MFI de la muestra en cada dilución. Los valores RFI finalmente se graficaron usando el software Prism (GraphPad). Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) y la unión máxima se determinaron usando un ajuste de curva de unión de un sitio en datos no transformados (Prism). El RFI se trazó usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 33. Los valores máximos de unión y K_D se resumen en la Tabla 35. Se realizaron dos experimentos independientes.

20

Resultados y conclusiones

Las curvas de unión de CD3/BCMA/CD38-118 y los puntos de referencia en células T CD38- humanas primarias se muestran en la Figura 33 y los valores de la constante de disociación de equilibrio asociada (K_D) en la Tabla 35 junto con la unión máxima. CD3/BCMA/CD38-118 mostró una

unión máxima más baja en las células T CD38 en comparación con los puntos de referencia CD3xBCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab, mientras que CD3/BCMA/CD38-118 mostró una afinidad de unión de 160 nM, similar a 83A10-TCBcv (155 nM), menor en comparación con alnuctamab (252 nM) y mayor en comparación con teclistamab (18 nM).

Molécula	Unión máxima (10 ³ RFI)	K _D (nM)
83A10-TCBcv	155 ± 18	155 ± 29
alnuctamab	153 ± 33	252 ± 25
Teclistamab	258 ± 38	18 ± 2
CD3/BCMA/CD38-118	18 ± 5	160 ± 36

Tabla 35: CD3/BCMA/CD38-118 se une a las células T humanas CD38 negativas. La tabla muestra K_D en nM and valores máximos de unión (Intensidad de Fluorescencia Relativa, RFI) en células T CD38 determinados mediante experimentos de citometría de flujo. Cada valor es la media +/- desviación estándar de cinco a seis donantes de células T de dos experimentos independientes.

Ejemplo 22 (d): Puntos de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA y unión de control a mieloma múltiple y líneas celulares knock out (KO) de BCMA o CD38

Material y métodos

Unión a líneas celulares de mieloma múltiple y BCMA o
CD38-knockout (KO)

Para evaluar cómo CD3/BCMA/CD38-118 se une a
5 BCMA y CD38 en comparación con los puntos de referencia
CD3xBCMA (83A10-TCBcv, alnuctamab, teclistamab) y evaluar
el efecto de la avidéz cuando se seleccionan dos
antígenos asociados a tumores, se realizaron ensayos de
afinidad basados en células en líneas celulares que
10 mostraban una expresión variable de CD38 y BCMA o que
carecían de uno de los antígenos (líneas celulares KO).

NCI-H929 silvestre (WT, por sus siglas en
inglés) (Sigma, 95050415, lote 17A027), NCI-H929 BCMA KO
(derivado de Sigma, 95050415, lote 17A027), NCI-H929 CD38
15 KO (derivado de Sigma, 95050415, lote 17A027), MOLP-8
(DSMZ, ACC 569, lote 14) y KMS-12-BM (DSMZ, ACC 551, lote
9) se sembraron a 1×10^5 células/pocillo en placas de
fondo redondo de 96 pocillos. Las placas se centrifugaron
a 350 g durante 3 minutos a 4 °C y las células se lavaron
20 dos veces con DPBS.

Las células se resuspendieron en 25 µl de
LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain (ThermoFisher
Scientific, L34976) diluido a 1/1'000 en DPBS e incubado 20
minutos a 4 °C. Después de dos lavados en regulador FACS
25 con azida, las células se resuspendieron en 100 µl de
regulador FACS frío que contenía diluciones seriadas de

CD3/BCMA/CD38-118, puntos de referencia (83A10-TCBcv, alnuctamab, teclistamab) y anticuerpos de control (CD3/BCMA/CD38-85 (control negativo irrelevante TREAT), CD3/BCMA/CD38-149 (Cl-D6/aglutinante irrelevante G6DU/B3-
5 C11 o CD3/DU/CD38) y CD3/BCMA/CD38-151 (Cl-D6/E6-G6/aglutinante irrelevante G6DU o CD3/BCMA/DU)) a partir de 800 nM (excepto para alnuctamab, la dosis inicial fue de 266 nM) y se diluyeron por 3. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, después se lavaron dos veces con
10 regulador FACS a 350 g durante 3 minutos, se resuspendieron en 50 µl de un anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG humana APC (Biolegend, 366906) diluido 1/400 en regulador FACS con azida y se incubaron 20 minutos a 4 °C. Después, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 25
15 µl de regulador FACS con azida. Las muestras se adquirieron en un instrumento iQue Screener Plus (IntelliCyt). Las células se clasificaron basadas en el tamaño de FSC vs SSC y se excluyeron los restos, los dobletes y las células muertas. Se analizó la población para la intensidad de
20 fluorescencia (MFI) media geométrica (geomean) de APC usando el software iQue Forecyt*. En las etapas posteriores del análisis solo se consideraron las muestras que mostraban al menos 2000 células en la puerta final. La intensidad de fluorescencia media geométrica relativa (RFI)
25 se calculó restando la MFI del control negativo de la MFI de la muestra en cada dilución. Los valores RFI finalmente

se graficaron usando el software Prism (GraphPad). Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) y la unión máxima se determinaron usando un ajuste de curva de unión de un sitio en datos no transformados (Prism). RFI se trazó usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 34 y la Figura 35. K_D y los valores máximos de unión se resumen en la Tabla 36 y la Tabla 37. Se realizaron tres experimentos independientes.

10 Resultados y conclusiones

Los resultados de la Figura 34 muestran las curvas de unión de CD3/BCMA/CD38-118 y los puntos de referencia en líneas celulares de mieloma múltiple que muestran una expresión variable de CD38 y BCMA (A: KMS-12-BM, B: MOLP-8, C: NCI-H929 WT, D: NCI-H929 BCMA KO, E: NCI-H929 CD38 KO). Los valores de K_D y de unión máxima se informan en la Tabla 36.

CD3/BCMA/CD38-118 mostró una unión máxima superior en todas las líneas celulares en comparación con los puntos de referencia CD3xBCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab. En la línea celular KMS-12-BM (caracterizada como células de baja expresión de BCMA y CD38), la unión máxima de CD3/BCMA/CD38-118 fue 5,3, 5,3 y 4,1 veces mayor en comparación con 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab respectivamente. En la línea celular MOLP-8 (caracterizada como células con baja

expresión de BCMA y alta expresión de CD38), CD3/BCMA/CD38-118 mostró una unión máxima 203, 354 y 110 veces mayor en comparación con 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab. En la línea celular NCI-H929 WT (caracterizada como células que expresan BCMA y CD38 en medio), la unión máxima de CD3/BCMA/CD38-118 fue 2,0, 2,4 y 1,8 veces mayor en comparación con los puntos de referencia CD3xBCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab. En la línea celular NCI-H929 BCMA KO (caracterizada como células BCMA negativas y con expresión media de CD38), 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab mostraron una unión nula o mínima (<2000 RFI), mientras que el candidato CD3/BCMA/CD38-118 mostró una unión máxima de 4'611 RFI. En la línea celular NCI-H929 CD38 KO (caracterizada como células CD38 negativas y que expresan medio BCMA), el aumento en la unión máxima en comparación con 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab fue de 2,0, 2,2 y 1,7 veces para CD3/BCMA/CD38-118.

El candidato CD3/BCMA/CD38-118 mostró una fuerte afinidad de unión en el rango nanomolar bajo con un K_D de 6,1 nM en KMS-12-BM. 83A10-TCBcv y alnuctamab mostraron el mismo rango de unión que CD3/BCMA/CD38-118 a KMS-12-BM con valores de K_D de 2,3 y 3,9 nM. En la línea celular NCI-H929, CD3/BCMA/CD38 mostró una afinidad de unión de 4,8 nM, similar a 83A10-TCBcv (2,7 nM) y alnuctamab (6,0 nM). En MOLP-8, mientras que el candidato CD3/BCMA/CD38-

118 mostró una unión con mediciones de K_D de rango nanomolar bajo de 9,6 nM, 83A10-TCBcv y alnuctamab mostraron una unión mínima a las células (K_D no cuantificable). Teclistamab mostró afinidades de unión

5 generales más bajas para las tres líneas celulares con valores de K_D de 21,8 nM para KMS-12-BM, 95,8 nM para MOLP-8 y 30,4 nM para células NCI-H929. En las células BCMA KO NCI-H929, el candidato CD3/BCMA/CD38-118 mostró la unión más fuerte, con una medición de K_D rango

10 nanomolar bajo de 120,6 nM, mientras que 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab mostraron una unión mínima o nula (K_D no cuantificable). En las células NCI-H929 CD38 KO, CD3/BCMA/CD38-118 mostró curvas de unión comparables con mediciones de K_D de rango nanomolar medio de 126,2

15 nM, mientras que los puntos de referencia CD3xBCMA, 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab, mostraron unión con valores de K_D más altos de 3,2, 8,1 y 46,3 nM, pero con una unión máxima dos veces inferior, respectivamente.

	KMS-12-BM		MOLP-8		NCI-H929 WT		NCI-H929 BCMA KO		NCI-H929CD38 KO	
	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)	Unión máxima (RFI)	K_D (nM)
83A10-TCBcv	6'949	2,3	1'252	NQ	40'821	2,7	Sin unión (255)	NQ	22'829	3,2
alnuctamab	6'876	3,9	719	NQ	34'282	6,0	Sin unión (101)	NQ	21'228	8,1
Teclistamab	8'964	21,8	2'321	95,8	44'698	30,4	Sin unión (104)	NQ	27'992	46,3

CD3/BCMA/ CD38-118	36'781	6,1	254'225	9,6	81'386	4,8	4'611	120,6	46'398	126,2
-----------------------	--------	-----	---------	-----	--------	-----	-------	-------	--------	-------

Tabla 36: Unión de los marcadores CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab a líneas celulares que muestran expresión variable de CD38 y BCMA.

5 La tabla muestra K_D en nM y valores máximos de unión en RFI en KMS-12-BM, MOLP-8, NCI-H929 WT, NCI-H929 BCMA KO y NCI-H929 CD38 KO, determinados por citometría de flujo.

Cada valor es la media de tres mediciones de tres experimentos individuales. NQ significa no medible.

10 Los resultados de la Figura 35 muestran las curvas de unión de las moléculas candidatas y de control CD3/BCMA/CD38-118 CD3/BCMA/CD38-149 (C1-D6/aglutinante irrelevante G6DU/B3-C11) y CD3/BCMA/CD38-151 (C1-D6/E6-G6/aglutinante irrelevante G6DU) en líneas celulares de
15 mieloma múltiple que muestran expresión variable de CD38 y BCMA (A: KMS-12-BM, B: MOLP-8, C: NCI-H929 WT, D: NCI-H929 BCMA KO, E: NCI-H929 CD38 KO). Los valores de K_D asociados y la unión máxima se informan en la Tabla 37.

Los anticuerpos CD3/BCMA/CD38-118 y de control
20 mostraron unión en todas las líneas celulares excepto las líneas NCI-H929 KO para cada molécula de control, como se diseñó. CD3/BCMA/CD38-118 mostró una unión máxima superior en comparación con las moléculas de control CD3/BCMA/CD38-149 (CD3/DU/CD38) y CD3/BCMA/CD38-151
25 (CD3/BCMA/DU) en la línea celular KMS-12-BM

(caracterizada como células de baja expresión de BCMA y CD38), en la línea celular MOLP-8 (caracterizada como células de baja expresión de BCMA y alta expresión de CD38) y en la línea celular NCI-H929 WT. En la línea celular NCI-H929 BCMA KO, la unión máxima fue similar para CD3/BCMA/CD38-118 y el control CD3/BCMA/CD38-149. En la línea celular CD38 KO, la unión máxima fue similar para el candidato CD3/BCMA/CD38-118 y el control CD3/BCMA/CD38-151, como se esperaba.

CD3/BCMA/CD38-118 mostró una fuerte unión en un rango nanomolar bajo con mediciones de KD de 6,1 nM en KMS-12-BM, 9,6 nM en MOLP-8 y 4,8 nM en NCI-H929 WT, mientras que CD3/DU/CD38 y CD3/BCMA/DU mostraron una unión en un rango nanomolar más alto en comparación con el candidato CD3/BCMA/CD38-118 con 45,6 nM y 71,2 nM, 32,1 nM y 260,1 nM, y 117,6 nM y 105,1 nM, respectivamente. En NCI-H929 BCMA KO, el candidato CD3/BCMA/CD38-118 y el control CD3/DU/CD38 mostraron una unión similar, en el rango nanomolar con mediciones de KD de 120,6 nM y 214,8 nM, respectivamente, mientras que CD3/BCMA/DU no mostró unión (KD no cuantificable). En NCI-H929 CD38 KO, CD3/BCMA/CD38-118 y el control CD3/BCMA/DU mostraron una unión similar, en el rango nanomolar con mediciones de KD de 126,2 nM y 147,8 nM, respectivamente, mientras que CD3/BCMA/CD38-149 no mostró unión (KD no cuantificable).

	KMS-12-BM		MOLP-8		NCI-H929 WT		NCI-H929 BCMA KO		NCI-H929CD38 KO	
	Unión máxima (RFI)	K _D (nM)	Unión máxima (RFI)	K _D (nM)	Unión máxima (RFI)	K _D (nM)	Unión máxima (RFI)	K _D (nM)	Unión máxima (RFI)	K _D (nM)
CD3/BCMA/CD38-118 (C1-D6/E6-G6/B3-C11)	36'781	6,1	254'225	9,6	81'386	4,8	4'611	120,6	46'398	126,2
CD3/BCMA/CD38-149 (C1-D6/G6DU/B3-C11 o CD3/DU/CD38)	6'273	45,6	165'651	32,1	26'757	117,6	3'565	214,8	123	NO
CD3/BCMA/CD38-151 (C1-D6/E6-G6/G6DU o CD3/BCMA/DU)	17'444	71,2	3'623	260,1	83'978	105,1	88	NO	48'478	147,8

Tabla 37: Unión del candidato CD3/BCMA/CD38 y los controles, CD3/DU/CD38 y CD3/BCMA/DU, a líneas celulares

5 que muestran expresión variable de CD38 y BCMA. La tabla muestra K_D en nM y valores máximos de unión en RFI en líneas celulares que muestran expresión variable de CD38 y BCMA, KMS-12-BM, MOLP-8, NCI-H929 WT, NCI-H929 BCMA KO y NCI-H929 CD38 KO, determinados por citometría de flujo.

10 Cada valor es la media de 3 mediciones de 3 experimentos individuales. G6DU representa un aglutinante irrelevante, denominado G6DU, en lugar de los brazos de unión BCMA o CD38 como se detalla en el Ejemplo 22(a). NO significa no medible.

15 En conjunto, los datos muestran que el candidato CD3/BCMA/CD38-118 demostró una menor unión a las células T (unión máxima menor) en comparación con teclistamab,

alnucltamab y 83A10-TCBcv. CD3/BCMA/CD38-118 también
mostró la capacidad de unión más fuerte hacia todas las
líneas de células de mieloma múltiple analizadas en
comparación con los puntos de referencia CD3xBCMA. En
5 concreto, la unión máxima a las líneas celulares de
mieloma múltiple fue mayor y la K_D fue menor para
CD3/BCMA/CD38-118 en comparación con teclistamab en todas
las líneas celulares.

CD3/BCMA/CD38-118 mostró una unión máxima más
10 alta con una afinidad similar en las células KMS-12-BM y
las células NCI-H929 WT, pero una mayor afinidad en las
células MOLP-8) en comparación con alnucltamab. Las
diferentes moléculas de control que contienen un brazo de
unión irrelevante, así como los estudios de unión usando
15 líneas celulares KO, ilustran el efecto de avidéz inducido
por la unión a dos antígenos. El aglutinante CD38 es
esencial para permitir la unión a células que no expresan
BCMA y aumenta sustancialmente la unión a células que
expresan BCMA baja.

20 El formato CD3/BCMA/CD38-118 muestra un fuerte
sinergismo cuando se expresan ambos antígenos.

Ejemplo 22 (e): CD3/BCMA/CD38-118 desencadena la lisis
tumoral en presencia de BCMA, CD38 y APRIL solubles

25

Material y métodos

Ensayo RDL con células tumorales KMS-12-BM que expresan
niveles bajos de BCMA y CD38 y el efecto de BCMA soluble,
CD38 y APRIL en la potencia de muerte

5 Para evaluar cómo la potencia de muerte de
CD3/BCMA/CD38-118 puede verse afectada por la presencia
individual o concomitante de factores solubles (BCMA
soluble, CD38 soluble y APRIL) en comparación con los
puntos de referencia CD3xBCMA (83A10-TCBcv, alnuctamab,
10 teclistamab), se realizaron ensayos RDL en la línea
celular de mieloma múltiple KMS-12-BM en presencia o
ausencia de los factores solubles solos o en combinación.

Las células mononucleares de sangre periférica
humana (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas de
15 donantes sanos obtenidas del Centro de Transfusión de
Epalinges (Suiza) usando aislamiento en gradiente de
densidad de Ficoll y se congelaron en medio de
congelación de células CryoStor10 (StemCell, núm. 07930).
Las células se descongelaron en un medio RPMI completo
20 precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino
fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de
aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 %
de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar
durante la noche a $1,5 \times 10^6$ células/ml. Veinte mil
25 células diana (KMS-12-BM, DSMZ, ACC 551, lote 9) marcadas
con el colorante de proliferación celular eFluor 670

(ThermoFisher Scientific, 65-0840-85) se sembraron con cien mil PBMC marcadas con el colorante de proliferación celular eFluor 450 (ThermoFisher Scientific, 65-0842-85) alcanzando una relación efector-diana de 5:1. Se
5 añadieron diluciones seriadas de CD3/BCMA/CD38-118, puntos de referencia (83A10-TCBcv, alnuctamab, teclistamab) a partir de 20 nM y diluidos 4 veces y anticuerpo de control (CD3/BCMA/CD38-85, control negativo). El ensayo se realizó en presencia o ausencia
10 de BCMA soluble, CD38 soluble y APRIL en concentraciones finales de 150, 2,8 y 100 ng/ml. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Después del período de incubación, se evaluó la lectura del ensayo RDL midiendo la actividad
15 citotóxica de las células T contra las células diana. La muerte de células tumorales se determinó midiendo el recuento absoluto de células diana vivas (células eFluor670+) usando el tinte verde fijable para células muertas LIVE/DEAD (ThermoFisher Scientific, L34970), y se
20 calculó como % de muerte respecto a ningún Ab = $[1 - (\text{recuentos absolutos de la muestra})/(\text{recuentos absolutos en presencia de células diana y efectoras sin tratamiento})] \times 100$. El porcentaje de citotoxicidad también se determinó midiendo el % de diana muerta o el
25 porcentaje de células eFluor670+L/D Green+. La mitad de las concentraciones efectivas máximas o EC₅₀ se calcularon

a partir de las curvas de mortalidad usando regresión no lineal de respuesta a la dosis sigmoidea. Se excluyeron valores en función de la bondad del ajuste ($R^2 > 0,7$), sobre el porcentaje de muerte espontánea de células tumorales (ventana de ensayo), valores de EC_{50} fuera de rango o porcentajes bajos de muerte máxima ($< 25\%$). Además, se aplicó un análisis estadístico para comparar la potencia de muerte del candidato CD3/BCMA/CD38-118 con cada punto de referencia (83A10-TCBcv, Alnuctamab, Teclistamab). La media de EC_{50} se compararon usando un modelo de efectos mixtos (REML) o un análisis ANOVA unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD ($*P < 0,05$).

Los valores de EC_{50} se graficaron usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 36A-E (% de muerte respecto a ningún Ab) y la Figura 37A-E (% de citotoxicidad) para condiciones individuales y en la Figura 38 para la comparación entre ningún factor soluble y la combinación de CD38 soluble, BCMA soluble y APRIL (A, % de muerte respecto a ningún Ab; B, % de citotoxicidad). Medias de valores de EC_{50} y la diferencia de pliegues se resumen en la Tabla 38 y la Tabla 39 (% de muerte respecto a ningún Ab) y en la Tabla 40 y la Tabla 41 (% de citotoxicidad). Se realizaron dos experimentos independientes con un total de seis donantes.

Resultados y conclusiones

Cuando se usaron los porcentajes de muerte respecto a ningún Ab como lectura para la muerte (Figura 36A-E, Figura 38A y Tabla 38 y Tabla 39), el candidato CD3/BCMA/CD38-118 y alnuctamab mostraron la muerte más eficiente de KMS-12-BM en ausencia de cualquier marcador soluble o en presencia de CD38 soluble con valores de EC_{50} subpicomolares de 0,9 y 0,8 pM para CD3/BCMA/CD38-118 y 0,7 y 1,1 pM para alnuctamab. En presencia de BCMA soluble, APRIL o la combinación de los tres factores, CD3/BCMA/CD38-118 mostró la mayor potencia de muerte, con valores de EC_{50} de 6,4, 6,3 y 13,2 pM, mientras que alnuctamab mostró valores de EC_{50} más altos de 262, 47,6 y 970 pM. En particular, en presencia de la combinación de factores solubles, la diferencia en comparación con la ausencia de factores solubles para CD3/BCMA/CD38-118 alcanzó 14 veces, mientras que alcanzó 1357 veces para alnuctamab. Otros puntos de referencia también mostraron una disminución de la potencia de muerte en presencia de factores solubles. Mientras que el punto de referencia CD3xBCMA 83A10-TCBcv y el teclistamab mostraron una fuerte muerte con valores de EC_{50} de rango picomolar bajos de 8,8 y 10,6 pM, en ausencia de factores solubles o en presencia de CD38 soluble, su potencia de muerte se redujo en presencia de BCMA soluble, APRIL o la combinación de todos los factores con valores de EC_{50} de rango picomolar altos 266, 532 y 1'026 pM para

83A10-TCBcv y 314, 130 y 972 pM para teclistamab. En presencia de la combinación de los tres factores, la diferencia en comparación con la ausencia de factores solubles para 83A10-TCBcv y teclistamab alcanzó 116 veces y 92 veces.

Factores solubles / Tratamientos	EC ₅₀ de % de muerte respecto a ningún Ab ± DE [pM]			
	CD3/BCMA/CD38-118	83A10-TCBcv	Alnuctamab	Teclistamab
Ninguno	0,9 ± 0,3	8,8 ± 5,3	0,7 ± 0,4	10,6 ± 5,9
sBCMA	6,4 ± 2,4	266 ± 211	262 ± 214	314±171
APRIL	6,3 ± 2,2	532 ± 420	47,6 ± 32,5	130 ± 94
sCD38	0,8 ± 0,3	10,8 ± 8,4	1,1 ± 0,5	15,6 ± 6,5
sBCMA+APRIL+sCD38	13,2 ± 8,7	1'026 ± 885	970 ± 898	972 ± 493

Tabla 38: El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de una línea celular de mieloma múltiple en presencia de factores solubles. La tabla muestra valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte (EC₅₀) usando el parámetro % de muerte respecto a ningún Ab determinado a partir del ensayo de lisis redirigida en la línea celular KMS-12-BM durante 48 h y usando una relación efector-diana de 5:1. Cada valor de EC₅₀ es la media +/- desviación estándar de cuatro a seis mediciones de dos experimentos individuales.

Factores solubles / Tratamientos	Diferencia de pliegues con la condición de factor no soluble (EC ₅₀ de % de muerte respecto a ningún Ab)			
	CD3/BCMA/CD38-118	83A10-TCBcv	Alnuctamab	Teclistamab
sBCMA	7	30	367	30
APRIL	7	60	67	12

sCD38	1	1	2	1
sBCMA+APRIL+sCD38	14	116	1357	92

Tabla 39: El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte
in vitro más potente de una línea celular de mieloma
múltiple en presencia de factores solubles en términos de
 5 diferencia de pliegues con respecto a la condición sin
factor soluble. La tabla muestra la diferencia de
pliegues en condiciones de factor no soluble de la mitad
de la concentración máxima efectiva de muerte (EC_{50})
informada anteriormente. Las diferencias de pliegue se
 10 calcularon usando más decimales que los que se muestran.

Cuando se usó el porcentaje de citotoxicidad
 como lectura para la muerte, los resultados fueron muy
 similares. La Figura 37A-E, la Figura 38B y la Tabla 40 y
 la Tabla 41 muestran que CD3/BCMA/CD38-118 y alnuctamab
 15 mostraron la potencia de muerte más eficiente contra KMS-
 12-BM en ausencia de cualquier marcador soluble o en
 presencia de CD38 soluble con valores de EC_{50} subpicomolar
 de 2,1 y 3,3 pM para CD3/BCMA/CD38-118 y 1,9 y 3,9 pM
 para alnuctamab. Sin embargo, en presencia de BCMA
 20 soluble, APRIL o la combinación de los tres factores,
 CD3/BCMA/CD38-118 mostró la mayor potencia de muerte, con
 un valor de EC_{50} de 23,3, 31,1 y 62,5 pM, mientras que
 alnuctamab mostró un valor de EC_{50} más alto de 706, 171 y
 3'060 pM. En particular, en presencia de la combinación
 25 de factores solubles, la diferencia en comparación con

ningún factor soluble para CD3/BCMA/CD38-118 alcanzó 30 veces, mientras que fue 1,647 veces para alnuctamab. Otros puntos de referencia también mostraron una disminución en su potencia de muerte en presencia de BCMA soluble, APRIL o los factores solubles. Mientras que 83A10-TCBcv y teclistamab mostraron una potencia de muerte con valores de EC₅₀ picomolares de 27,1 y 27,4 pM, respectivamente en ausencia de factores solubles o 70,4 y 54,2 pM en presencia de CD38 soluble, su potencia se redujo en presencia de BCMA soluble, APRIL o la combinación de todos los factores con valor de EC₅₀ de rango subnanomolar de 842, 2'018 y 5'144 pM para 83A10-TCBcv y 2047, 677 y 3'038 pM para teclistamab. En presencia de la combinación de los tres factores, la diferencia en comparación con factores no solubles para 83A10-TCBcv y teclistamab alcanzó 190 y 111 veces, respectivamente.

Factores solubles/ Tratamientos	EC ₅₀ de % de citotoxicidad ± DE [pM]			
	CD3/BCMA/CD38-118	83A10-TCBcv	Alnuctamab	Teclistamab
Ninguno	2,1 ± 0,8	27,1 ± 22,2	1,9 ± 1,0	27,4 ± 17,1
sBCMA	23,3 ± 13,7	842 ± 730	706 ± 530	2'047 ± 2'486
APRIL	31,1 ± 18,6	2'018 ± 1'480	171 ± 138	677 ± 582
sCD38	3,3 ± 1,7	70,4 ± 72,2	3,9 ± 3,5	54,2 ± 30,6
sBCMA+APRIL+sCD38	62,5 ± 40,4	5'144 ± 4'182	3'060 ± 2'008	3'038 ± 1'889

Tabla 40: El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de una línea celular de mieloma

múltiple en presencia de factores solubles. La tabla muestra valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte (EC_{50}) usando la lectura de % de citotoxicidad, determinada a partir del ensayo de lisis redirigida en la línea celular KMS-12-BM durante 48 h y usando una relación efector-diana de 5:1. Cada valor de EC_{50} es la media +/- desviación estándar de seis mediciones (de 6 donantes diferentes) de dos experimentos independientes.

Factores solubles/ Tratamientos	Diferencia de pliegues con respecto a la condición de factor no soluble (EC_{50} del % de citotoxicidad)			
	CD3/BCMA/CD38-118	83A10-TCBcv	Alnuctamab	Teclistamab
sBCMA	11	31	380	75
APRIL	15	74	92	25
sCD38	2	3	2	2
sBCMA+APRIL+sCD38	30	190	1647	111

10

Tabla 41: El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce la muerte in vitro más potente de una línea celular de mieloma múltiple en presencia de factores solubles en términos de diferencia de pliegues con respecto a la condición sin factor soluble. La tabla muestra la diferencia de pliegues en condiciones de factor no soluble de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte (EC_{50}) informada anteriormente. Las diferencias de pliegue se calcularon usando más decimales que los que se muestran.

En conjunto, estos datos muestran que CD3/BCMA/CD38-118 mató con una potencia de muerte similar en comparación con alnuctamab en ausencia de factores

solubles, y una mejor potencia de muerte en comparación con 83A10-TCBcv y teclistamab en la línea celular KMS-12-BM. Todas las moléculas que contenían el aglutinante anti-BCMA se vieron afectadas por la presencia de BCMA soluble, APRIL o la combinación de factores solubles, lo que redujo su potencia de muerte. El candidato CD3/BCMA/CD38-118 mantuvo una mejor potencia de muerte con un aumento de alrededor de 14/30 veces de valor de EC_{50} de muerte comparado con la condición sin factores solubles. Otros puntos de referencia mostraron un aumento de más de 100 veces del valor de EC_{50} respectivo de muerte en presencia de factores solubles. El análisis estadístico mostró que la potencia de muerte de CD3/BCMA/CD38-118 en presencia de BCMA soluble, APRIL o la combinación de factores solubles fue significativamente mayor en comparación con la potencia de muerte de cualquiera de los puntos de referencia CD3xBCM A.

Ejemplo 22 (f): Ensayo RDL con células T y células tumorales de mieloma múltiple que expresan diversos niveles de BCMA y CD38

Material y métodos

25

Ensayo RDL con células T y células tumorales de mieloma múltiple que expresan diversos niveles de BCMA y CD38

Para evaluar la potencia de muerte de CD3/BCMA/CD38-118 en comparación con los puntos de referencia CD3xBCMA (83A10-TCBcv, alnuctamab, teclistamab), se realizaron ensayos RDL usando células T aisladas en las líneas celulares de mieloma múltiple KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929.

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos obtenidas del Centro de Transfusión de Epalinges (Suiza) usando aislamiento en gradiente de densidad de Ficoll y se congelaron en medio de congelación de células CryoStor10 (StemCell, núm. 07930). Las células se descongelaron en un medio RPMI completo precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante la noche a $1,5 \times 10^6$ células/ml. Veinte mil células diana (KMS-12-BM, DSMZ, ACC 551, lote 9; MOLP-8, DSMZ, ACC 569, lote 14; Las células T (NCI-H929, Sigma, 95050415, lote 17A027) marcadas con el colorante de proliferación celular eFluor 670 (ThermoFisher Scientific, 65-0840-85) se sembraron con cien mil células T recién aisladas usando el kit de aislamiento de células

T humanas EasySep™ (StemCell, núm. 17951) alcanzando una relación efector-diana de 5:1. Se añadieron diluciones seriadas de CD3/BCMA/CD38-118, puntos de referencia (83A10-TCBcv, alnuctamab, teclistamab) o anticuerpos de control (CD3/BCMA/CD38-149 (C1-D6/aglutinante irrelevante G6DU/B3-C11 o CD3/DU/CD38) y CD3/BCMA/CD38-151 (C1-D6/E6-G6/aglutinante irrelevante G6DU o CD3/BCMA/DU)) a partir de 20 nM y diluidos 10 veces, y una dosis única de anticuerpo de control (CD3/BCMA/CD38-85, control negativo). Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Después del período de incubación, se evaluó la lectura del ensayo RDL midiendo la actividad citotóxica de las células T contra las células diana. La muerte de células tumorales se determinó midiendo el recuento absoluto de células diana vivas (células eFluor670+) usando el tinte verde fijable para células muertas LIVE/DEAD (ThermoFisher Scientific, L34970), y se calculó como % de muerte respecto a ningún Ab = $[1 - (\text{recuentos absolutos de la muestra}) / (\text{recuentos absolutos en presencia de células diana y efectoras sin tratamiento})] \times 100$. Los porcentajes de citotoxicidad también se determinaron midiendo el % de diana muerta o el porcentaje de células eFluor670+L/D Green+. La mitad de las concentraciones efectivas máximas o EC₅₀ se calcularon a partir de los valores de mortalidad usando regresión no lineal de

respuesta a la dosis sigmoidea. Se excluyeron valores en función de la bondad del ajuste ($R^2 > 0,7$), sobre el porcentaje de muerte espontánea de células tumorales (ventana de ensayo), valores de EC_{50} fuera de rango y
5 porcentajes bajos de muerte ($< 25\%$). Se aplicaron análisis estadísticos para comparar la potencia de muerte del candidato CD3/BCMA/CD38-118 con cada referencia (83A10-TCBcv, alnuctamab, teclistamab) y anticuerpos de control. Las medias de EC_{50} se compararon usando un ANOVA
10 unidireccional pareado seguido de una comparación post-hoc de Tukey HSD ($*P < 0,05$).

Los valores de EC_{50} se graficaron usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 39A-C y la Figura 40A-C (% de muerte respecto a ningún Ab) y la
15 Figura 39D-F y la Figura 40D-F (% de citotoxicidad) y las medias de los valores de EC_{50} se resumen en pM en la Tabla 42 y la Tabla 44 (% de muerte respecto a ningún Ab) y en la Tabla 43 y la Tabla 45 (% de citotoxicidad). Se realizaron un total de tres experimentos independientes con un total
20 de seis donantes.

Resultados y conclusiones

Considerando los porcentajes de muerte respecto a ningún Ab, los resultados en la Figura 39A-C muestran
25 los valores de EC_{50} para los puntos de referencia de muerte CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA en las líneas

celulares KMS-12-BM (A), MOLP-8 (B) y NCI-H929 (C). Los valores de medias de EC₅₀ se informan en la Tabla 42. CD3/BCMA/CD38-118 y alnuctamab mostraron una potencia de muerte comparable a KMS-12-BM, caracterizada como células

5 de baja expresión de BCMA y CD38, y superior a la potencia de muerte de 83A10-TCBcv y teclistamab, con valores de EC₅₀ de 1,5 pM (CD3/BCMA/CD38-118), 1,5 pM (alnuctamab), 11,7 (83A10-TCBcv) y 14,3 pM (teclistamab). En la línea celular MOLP-8, caracterizada como células

10 con baja expresión de BCMA y alta de CD38, CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia de muerte muy fuerte con valor de EC₅₀ picomolar de 0,2 pM, mientras que los puntos de referencia CD3xBCMA desencadenaron la muerte con valores de EC₅₀ más altos de 5,0 pM para alnuctamab, 65,1 pM para

15 83A10-TCBcv y 54,7 pM para teclistamab. En la línea celular NCI-H929, caracterizada como células que expresan BCMA y CD38 en medio, CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia de muerte superior en comparación con los puntos de referencia, con valor de EC₅₀ picomolar bajo de 1,2

20 pM, mientras que los puntos de referencia CD3xBCMA desencadenaron la muerte con valores de EC₅₀ más altos de 6,2 pM para alnuctamab, 7,1 pM para 83A10-TCBcv y 27,7 pM para teclistamab.

Líneas celulares/ Tratamientos	EC ₅₀ de % de muerte respecto a ningún Ab ± DE [pM]			
	CD3/BCMA/CD38-118	83A10-TCBcv	Alnuctamab	Teclistamab

KMS-12-BM	1,5 ± 0,9	11,7 ± 8,0	1,5 ± 0,3	14,3 ± 5,2
MOLP-8	0,2 ± 0,0	65,1 ± 62,4	5,0 ± 3,8	54,7 ± 11,7
NCI-H929	1,2 ± 0,4	7,1 ± 3,4	6,2 ± 2,8	27,7 ± 4,2

Tabla 42: El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce una
 fuerte muerte in vitro de líneas celulares de mieloma
 múltiple en comparación con los puntos de referencia (%
 5 de muerte respecto a ningún Ab). La tabla muestra valores
 de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte
 (EC₅₀) usando el parámetro % de muerte respecto a ningún
 Ab determinado a partir del ensayo de lisis redirigida
 con células T en las líneas celulares KMS-12-BM, MOLP-8 y
 10 NCI-H929 durante 48 h y usando una relación efector-diana
 de 5:1. Cada valor de EC₅₀ es la media +/- desviación
 estándar de un máximo de cinco mediciones incluidas (de 6
 donantes diferentes) de tres experimentos independientes.

Cuando se usó el porcentaje de citotoxicidad como
 15 lectura para la muerte, los resultados fueron muy
 similares. La figura 39D-F muestra los valores de EC₅₀ para
 los puntos de referencia CD3/BCMA/CD38-118 y CD3xBCMA que
 eliminan las líneas celulares KMS-12-BM (D), MOLP-8 (E) y
 NCI-H929 (F). Los valores de medias de EC₅₀ se informan en
 20 la Tabla 43. CD3/BCMA/CD38-118 y alnuctamab mostraron una
 potencia de muerte comparable contra las células KMS-12-BM,
 caracterizadas como células de baja expresión de BCMA y
 CD38, y superior a la potencia de muerte de 83A10-TCBcv y
 teclistamab, con valores de EC₅₀ de 2,2 pM, 2,2 pM, 16,4 y

21,3 pM respectivamente. En la línea celular MOLP-8, caracterizada como células con baja expresión de BCMA y alta de CD38, CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia de muerte muy fuerte con valor de EC₅₀ subpicomolar de 0,3 pM, mientras que los puntos de referencia CD3xBCMA desencadenaron la muerte con valor de EC₅₀ más alto de 3,5 pM para alnuctamab, 43,8 pM para 83A10-TCBcv y 58,9 pM para teclistamab. En la línea celular NCI-H929, caracterizada como células que expresan BCMA y CD38 med, CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia de muerte superior en comparación con los puntos de referencia, con valor de EC₅₀ picomolar bajo de 2,0 pM, mientras que los puntos de referencia CD3xBCMA desencadenaron la muerte con un valor de EC₅₀ más alto de 12,1 pM para alnuctamab, 11,4 pM para 83A10-TCBcv y 60,5 pM para teclistamab.

Líneas celulares/ Tratamientos	EC ₅₀ de % de citotoxicidad ± DE [pM]			
	CD3/BCMA/CD38-118	83A10-TCBcv	Alnuctamab	Teclistamab
KMS-12-BM	2,2 ± 0,7	16,4 ± 11,1	2,2 ± 0,7	21,3 ± 3,1
MOLP-8	0,3 ± 0,1	43,8 ± 26,2	3,5 ± 1,2	58,9 ± 13,5
NCI-H929	2,0 ± 0,5	11,4 ± 5,1	12,1 ± 4,1	60,5 ± 11,7

Tabla 43: El candidato CD3/BCMA/CD38-118 induce una fuerte muerte in vitro de líneas celulares de mieloma múltiple en comparación con los puntos de referencia (% de citotoxicidad). La tabla muestra valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte (EC₅₀) usando el parámetro % de citotoxicidad determinado a

partir del ensayo de lisis redirigida con células T en las líneas celulares KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929 durante 48 h y usando una relación efector-diana de 5:1. Cada valor de EC₅₀ es la media +/- desviación estándar de seis mediciones (de seis donantes diferentes) de tres experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 39A-F, tanto para el % de muerte respecto a ningún Ab como para el % de citotoxicidad, el candidato CD3/BCMA/CD38-118 desencadenó estadísticamente la mayor potencia de muerte en comparación con otros tratamientos CD3xBCMA, 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab, contra las líneas celulares MOLP-8 y NCI-H929, así como en la línea celular KMS-12-BM en comparación con 83A10-TCBcv y teclistamab.

Considerando los porcentajes de muerte respecto a ningún Ab, los resultados en la Figura 40A-C muestran los valores de EC₅₀ para CD3/BCMA/CD38-118 y moléculas de control para las líneas celulares KMS-12-BM (A), MOLP-8 (B) y NCI-H929 (C). Los valores de medias de EC₅₀ se informan en la Tabla 44. CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia de muerte superior en comparación con las moléculas de control, CD3/BCMA/CD38-149 (CD3/DU/CD38) y CD3/BCMA/CD38-151 (CD3/BCMA/DU), o la combinación de -149 y -151 contra todas las líneas celulares.

25

Líneas celulares/	EC ₅₀ de % de muerte respecto a ningún Ab ± DE [pM]
-------------------	--

Tratamientos	CD3/BCMA/ CD38-118	CD3/BCMA/CD38-151 (C1-D6/E6-G6/ G6DU o CD3/BCMA/DU)	CD3/BCMA/ CD38-149 (C1-D6/G6DU/ B3-C11 o CD3/DU/CD38)	CD3/BCMA/CD38-149+
KMS-12-BM	1,5 ± 0,9	116 ± 58	NQ	87 ± 17
MOLP-8	0,2 ± 0,0	330 ± 247	3'353 ± 1471	207 ± 17
NCI-H929	1,2 ± 0,4	130 ± 47	NQ	123 ± 50

Tabla 44: CD3/BCMA/CD38-118 induce una fuerte muerte in vitro de líneas celulares de mieloma múltiple en comparación con los controles (% de muerte respecto a ningún Ab). La tabla muestra valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte (EC_{50}) usando el parámetro % de muerte respecto a ningún Ab determinado a partir del ensayo de lisis redirigida con células T en las líneas celulares KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929 durante 48 h y usando una relación efector-diana de 5:1. Cada valor de EC_{50} es la media +/- desviación estándar de un máximo de cinco incluidas donantes de tres experimentos independientes.

NQ significa no medible.

Cuando se usó el porcentaje de citotoxicidad como medida de muerte, los resultados fueron muy similares. La figura 40D-F muestra los valores de EC_{50} para CD3/BCMA/CD38-118 y moléculas de control para las líneas celulares KMS-12-BM (D), MOLP-8 (E) y NCI-H929 (F). Los valores de medias de EC_{50} se informan en la Tabla 45. CD3/BCMA/CD38-118 desencadenó una potencia de muerte superior en comparación

con las moléculas de control, CD3/BCM A/CD38-149 (CD3/DU/CD38) y CD3/BCM A/CD38-151 (CD3/BCMA/DU), o la combinación de -149 y -151 contra todas las líneas celulares.

5

Líneas celulares/ Tratamientos	EC ₅₀ de % de citotoxicidad ± DE [pM]			
	CD3/BCMA/CD38-118	CD3/BCMA/ CD38-151 (C1-D6/E6- G6/G6DU o CD3/BCMA/DU)	CD3/BCMA/ CD38-149 (C1-D6/G6DU/ B3-C11 o CD3/DU/CD38)	CD3/BCMA/ CD38-149+ CD3/BCMA/ CD38-151
KMS-12-BM	2,2 ± 0,7	164 ± 56	NQ	172 ± 42
MOLP-8	0,3 ± 0,1	399 ± 169	2'278 ± 320	452 ± 254
NCI-H929	2,0 ± 0,5	229 ± 75	NQ	276 ± 95

Tabla 45: CD3/BCMA/CD38-118 muestra un fuerte poder de muerte in vitro de líneas celulares de mieloma múltiple en comparación con los controles (% de citotoxicidad). La
10 tabla muestra valores de la mitad de la concentración máxima efectiva de muerte (EC₅₀) usando el parámetro % de citotoxicidad determinado a partir del ensayo de lisis
redirigida con células T en las líneas celulares KMS-12-BM, MOLP-8 y NCI-H929 durante 48 h y usando una relación
15 efector-diana de 5:1. Cada valor de EC₅₀ es la media +/- desviación estándar de un máximo de seis incluidos donantes de tres experimentos individuales.

NQ significa no medible.

Tomados en conjunto y considerando ambos
20 parámetros, % de muerte respecto a ningún Ab y % de citotoxicidad, los datos muestran que CD3/BCMA/CD38-118

demostró una potencia de muerte estadísticamente superior contra todas las líneas celulares en comparación con las moléculas de control CD3/BCMA/CD38-151 (C1-D6/E6-G6/ligante irrelevante G6DU), CD3/BCMA/CD38-149 y la combinación de CD3/BCMA/CD38-151 y CD3/BCMA/CD38-149. Esto confirma la observación previa del efecto de avidez inducido por la unión a dos antígenos, lo que conduce a una fuerte muerte de las células de mieloma múltiple que expresan CD38 y BCMA, con diversos niveles de expresión.

Además, el candidato CD3/BCMA/CD38-118 desencadenó estadísticamente la mayor potencia de muerte en comparación con otros tratamientos CD3xBCMA, 83A10-TCBcv, alnuctamab y teclistamab, contra las líneas celulares MOLP-8 y NCI-H929, así como en la línea celular KMS-12-BM en comparación con 83A10-TCBcv y teclistamab. CD3/BCMA/CD38-118 permitió la potente muerte de células BCMA de baja expresión, como las líneas celulares de mieloma múltiple MOLP-8 y KMS-12-BM, un nivel de expresión que también se puede encontrar en pacientes como lo describen Seckinger et al [Seckinger et al., 2017, Cancer Cell, 31: 396-410].

Ejemplo 22 (g): Ensayo MMoAK con PBMC humanas y células tumorales de mieloma múltiple KMS-12-BM

25

Materiales y métodos

Para evaluar la potencia de muerte de CD3/BCMA/CD38-118 en comparación con la combinación del punto de referencia de CD3xBCMA teclistamab y el punto de referencia del anticuerpo monoclonal anti-CD38 daratumumab, se realizaron ensayos MMoAK usando PBMC humanos en la línea celular de mieloma múltiple KMS-12-BM.

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos obtenidas del Centro de Transfusión de Epalinges (Suiza) usando aislamiento en gradiente de densidad de Ficoll y se congelaron en medio de congelación de células CryoStor10 (StemCell, núm. 07930). Las células se descongelaron en un medio RPMI completo precalentado (RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se dejaron reposar durante la noche a $1,5 \times 10^6$ células/ml. Veinte mil células diana (KMS-12-BM, DSMZ, ACC 551, lote 9) marcadas con el colorante de proliferación celular eFluor 670 (ThermoFisher Scientific, 65-0840-85) se sembraron con cien mil células PBMC marcadas con el colorante de proliferación celular eFluor 450 (ThermoFisher Scientific, 65-0842-85) alcanzando una relación efector-diana de 5:1. Se realizaron diluciones seriadas de

CD3/BCMA/CD38-118 y teclistamab a partir de 10 nM, diluidos 10 veces, y se añadió una dosis única de anticuerpos de control (IgG1 humana o CD3/BCMA/CD38-85, control negativo). Las placas se incubaron durante 48 h, a 37 °C, 5 % de CO2 en una atmósfera humidificada. Se usaron dos lecturas diferentes para evaluar la muerte de las células tumorales diana. El porcentaje de muerte respecto a ningún Ab (normalizado a la condición sin anticuerpos) se determinó midiendo el recuento absoluto de células diana vivas (células eFluor670+) usando el tinte verde para células muertas fijable LIVE/DEAD (ThermoFisher Scientific, L34970), y se calculó como % de muerte por falta de anticuerpos = $[1 - (\text{recuentos absolutos de la muestra})/(\text{recuentos absolutos en presencia de células diana y efectoras sin tratamiento})] \times 100$. El porcentaje de citotoxicidad se determinó midiendo el % de diana muerta o el porcentaje de células eFluor670+L/D green+. Se eligieron dos concentraciones, 10 y 100 pM de CD3/BCMA/CD38-118 o teclistamab para evaluar la muerte de CD3/BCMA/CD38-118 en comparación con la combinación de teclistamab y daratumumab, que se dosificó a 100 nM. Los valores de muerte de las concentraciones de 10 pM y 100 pM se representaron gráficamente en histogramas. Se realizaron análisis estadísticos sobre esos valores graficados (9 donantes) usando una prueba ANOVA de medidas repetidas pareadas por

donante, seguida de comparaciones HSD de Tukey post-hoc (*P<0,05).

Los valores de muerte inducidos por 10 pM o 100 pM de CD3/BCMA/CD38-118 y teclistamab, así como daratumumab a 100 nM y la combinación de teclistamab y daratumumab se graficaron usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 41A y la Figura 41B (% de muerte respecto a ningún Ab) y la Figura 41C y la Figura 41D (% de citotoxicidad), los resultados de 10 pM se presentan en la Figura 41A-C y los resultados de 100 pM en la Figura 41B y la Figura 41D. Se realizaron tres experimentos independientes.

Resultados y conclusiones

Considerando los porcentajes de respecto a ningún Ab, los resultados en la Figura 41A y la Figura 41B muestran el porcentaje de muerte para CD3/BCMA/CD38-118 (a 10 o 100 pM), daratumumab a 100 nM, teclistamab (a 10 o 100 pM) y la combinación de daratumumab y teclistamab. A 10 y 100 pM, la muerte de teclistamab mejoró ligeramente cuando se combinó con daratumumab a 100 nM como lo describieron Frerichs et al [Frerichs et al., 2020, Clin. Cancer Res., 26(9):2203-15]. A 10 pM (Figura 41A), CD3/BCMA/CD38-118 mostró una muerte estadísticamente superior de células KMS-12-BM en comparación con daratumumab, teclistamab y la combinación de ambos. A 100

pM (Figura 41B), CD3/BCMA/CD38-118 mostró una muerte estadísticamente superior en comparación con daratumumab y teclistamab. La comparación de CD3/BCMA/CD38-118 con la combinación de ambos no fue estadísticamente diferente en
5 esta concentración (valor $p = 0,5082$).

Cuando se usó el porcentaje de citotoxicidad como lectura para la muerte, los resultados fueron muy similares. La Figura 41C y la Figura 41D muestran el porcentaje de muerte para CD3/BCMA/CD38-118 (a 10 o 100
10 pM), daratumumab a 100 nM, teclistamab (a 10 o 100 pM) y la combinación de daratumumab y teclistamab. A 10 y 100 pM, la muerte de teclistamab mejoró ligeramente cuando se combinó con daratumumab a 100 nM. A concentraciones de 10 pM (Figura 41C) y 100 pM (Figura 41D), CD3/BCMA/CD38-118
15 mostró una muerte estadísticamente superior de células KMS-12-BM en comparación con daratumumab, teclistamab y la combinación de ambos.

En conjunto y considerando tanto el porcentaje de muerte respecto a ningún Ab como el porcentaje de
20 citotoxicidad, CD3/BCMA/CD38-118 demostró una potencia de muerte estadísticamente superior contra la línea celular KMS-12-BM en comparación con daratumumab a 100 nM, teclistamab a 10 o 100 pM y la combinación de daratumumab a 100 nM y teclistamab a 10 o 100 pM.

Ejemplo 22 (h): Ensayos de muerte usando muestras de pacientes

Material y métodos

5

Ensayos de muerte usando muestras de pacientes

Para caracterizar mejor el CD3/BCMA/CD38-118 en comparación con un punto de referencia CD3xBCMA (teclistamab), se realizaron ensayos de muerte en células mononucleares de médula ósea (BMMC) o muestras de sangre de pacientes con mieloma múltiple (recién diagnosticado, latente y recidivante/refractario), así como pacientes con leucemia de células plasmáticas (PCL) y macroglobulinemia de Waldenström para probar la capacidad del CD3/BCMA/CD38-118 para eliminar células de mieloma múltiple redirigiendo las células T del paciente.

Las BMMC se aislaron del aspirado de médula ósea o de las PBMC de la sangre de muestras de pacientes, recolectadas del Hospital Universitario de Ginebra, Suiza y los Hospitales Universitarios de Oxford (OUH, Reino Unido) usando el aislamiento por gradiente de densidad de Ficoll. El ensayo se realizó en medio RPMI completo (RPMI suplementado con 10 % de suero humano, 3 ng/ml de IL-6, 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de penicilina/estreptomicina). Se incubaron de cien a doscientas mil células con

diluciones seriadas de CD3/BCMA/CD38-118, puntos de referencia (teclistamab) a partir de 10 a 100 nM y diluidos 10 veces, y una dosis única de anticuerpos de control (CD3/BCMA/CD38-85, IgG4 humana, IgG1 humana). Las
5 placas se incubaron durante 17-22 h a 37 °C, 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Después del período de incubación, se evaluó la lectura del ensayo de muerte midiendo la actividad citotóxica de las células T contra las células CD138+ con un panel de 10 colores que incluía
10 un marcador CD138 para células tumorales. La muerte de células tumorales se determinó midiendo el recuento absoluto de células CD138⁺ vivas usando el tinte azul para células muertas fijable LIVE/DEAD (ThermoFisher Scientific, L23105, 1/500), y calculado como % de muerte
15 respecto a ningún Ab= $[1 - (\text{recuento absoluto de CD138}^+ \text{ vivas}) / (\text{recuento absoluto de CD138}^+ \text{ vivos en BMDC sin tratamiento})] \times 100$. Las curvas de muerte se trazaron usando el software Prism (GraphPad) como se muestra en la Figura 42 (% de muerte de células CD138⁺ respecto a ningún
20 Ab). Los porcentajes de muerte respecto a ningún Ab que se muestran en la Figura 43 se compararon usando un modelo ANOVA de dos vías pareado seguido de una comparación post-hoc múltiple de Sidak (*P<0,05). La lista de muestras se resume en la Tabla 46. Se realizaron once experimentos
25 independientes con once muestras de pacientes.

Identificación de muestra	Estado del paciente
Muestra 1	Leucemia de células plasmáticas (PCL)
Muestra 2	Macroglobulinemia de Waldenström
Muestra 3	Mieloma múltiple recidivante/refractario (r/r MM)
Muestra 4	Mieloma múltiple latente (MM latente)
Muestra 5	Mieloma múltiple latente (MM latente)
Muestra 6	Mieloma múltiple: recién diagnosticado
Muestra 7	Mieloma múltiple: recién diagnosticado
Muestra 8	Mieloma múltiple: recién diagnosticado
Muestra 9	Mieloma múltiple recidivante/refractario (r/r MM)
Muestra 10	Mieloma múltiple recidivante/refractario (r/r MM)
Muestra 11	Mieloma múltiple: recién diagnosticado

Tabla 46: Lista de muestras de pacientes incluidas en el estudio (nomenclatura en la Figura 42A-D)

5 Resultados y conclusión:

Los resultados de la Figura 42A-D muestran las curvas de muerte de células CD138⁺ en cuatro muestras de pacientes para CD3/BCMA/CD38-118 y el punto de referencia CD3xBCMA teclistamab. En todas las muestras analizadas de

10 diversas enfermedades, MM latente (A), MM recién diagnosticado (B), MM r/r (C) y PCL (D), CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia de muerte superior en comparación con teclistamab. Las figuras 42B y D muestran las curvas de muerte de células CD138⁺ en una muestra de paciente con MM

15 y leucemia de células plasmáticas (PCL) recién diagnosticados, los valores de EC₅₀ de muerte asociados con esas curvas muestran un aumento de 115 o 38 veces en la potencia de muerte para CD3/BCMA/CD38-118 (EC₅₀ = 7,2 y 9,1

pM) en comparación con teclistamab ($EC_{50} = 829$ y $351,7$ pM). Además, como se muestra en la Figura 43, el candidato CD3/BCMA/CD38-118 desencadenó estadísticamente la mayor potencia de muerte en comparación con teclistamab, para cada concentración probada. A $0,1$ y $0,01$ nM, teclistamab mostró alrededor de un 8-24 % de muerte de células CD138+, mientras que CD3/BCMA/CD38-118 mantuvo un 41-56 % de muerte con la dosis más baja.

10 Ejemplo 23: Eficacia de TREAT CD3/BCMA/CD38-118, BEAT
CD3/CD38 y Teclistamab en un modelo murino tumoral
BCMA|OW CD38|OW KMS-12-BM in vivo

Materiales y métodos

15

Ganadería y toma de muestras de sangre

Los experimentos *in vivo* se realizaron en hembras NSG inmunodeficientes de 6 a 7 semanas de edad (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1wjI}/SzJ) ratones de CHARLES RIVER LABORATORIES Francia. Todos los ratones se mantuvieron bajo condiciones ambientales estandarizadas en jaulas de roedores (20 ± 1 °C de temperatura ambiente, 50 ± 10 % de humedad relativa, ciclo de luz-oscuridad de 12 horas). Los ratones recibieron alimentos y ropa de cama irradiados y

20 0,22 µm de agua potable filtrada. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos

25

aprobados por las autoridades veterinarias del Cantón de Vaud, Suiza. Criterios de exclusión: si los animales mostraban signos de enfermedad de injerto contra huésped (EICH), un efecto común en ratones humanizados con células mononucleares de sangre periférica sistémicas (PBMC), se los sacrificaba antes del punto final del estudio (o antes de que el volumen del tumor alcanzara los 1000 mm³) y fueron excluidos del análisis.

10 Modelo de ratón humanizado con tumor subcutáneo KSM-12-BM y PBMC sistémicos

Se realizaron tres experimentos y se denominaron, respectivamente, estudios KMS_12, KMS_13 y KMS_14. Estudio KMS_12. Aumento de la dosis de TREAT CD3/BCMA/CD38-118, BEAT CD3/CD38 y Teclistamab en tumores KMS-12-BM. A los ratones hembra NSG se les injertó por vía subcutánea (sc) 1×10^7 células tumorales de mieloma múltiple (MM) KMS-12-BM e inoculadas intraperitonealmente (ip) con 1×10^7 PBMC de un donante humano sano (Donante C) el mismo día (8 ratones por grupo; 10 grupos). Los ratones fueron aleatorizados según el volumen del tumor 8 días después del xenoinjerto y se les inyectó por vía intravenosa (iv) al día siguiente con Vehículo, CD3/BCMA/CD38-118 (a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg), BEAT CD3/CD38 y Teclistamab (a 2,5, 0,5 y 0,1 mg/kg) una vez por semana durante 3 semanas. El volumen del tumor se

evaluó según la medición del tamaño del tumor con un calibrador tres veces por semana. El análisis ex vivo se realizó el día 13 (n = 2-3 ratones por grupo) en grupos seleccionados. Se extrajeron bazos y tumores y se realizó un análisis FACS. Se recogió suero de ratón el día 13, 14 o 21 para determinar la concentración mínima de la molécula usando un método ELISA de captura específico para cada molécula (consulte la sección de ensayo ELISA del material y métodos). Cuando los ratones alcanzaron un volumen tumoral de 1000 mm³ antes de finalizar el estudio (día 21), se realizó la recolección de muestras correspondientes antes de la tercera dosis (día 13/14). Este experimento se realizó una vez.

Estudio KMS_13. Evaluación de la eficacia in vivo de BEAT CD3/CD38 en tumores KMS-12-BM, en presencia o ausencia de inmunoglobulina intravenosa (IVIG). A los ratones hembra NSG se les injertó sc con 1 x 10⁷ células tumorales KMS-12-BM e inoculadas ip con 1 x 10⁷ PBMC de un donante humano sano (Donante E) el mismo día (3-5 ratones por grupo; 5 grupos). Los ratones fueron aleatorizados basado en el volumen del tumor 8 días después del xenoinjerto y se les inyectó por vía intravenosa el mismo día (día -1) 200 mg/kg de IVIG (Privigen) o PBS y después dos veces por semana. La dosificación (iv) del vehículo, CD3/BCM A/CD38-118 a 0,5 mg/kg o BEAT CD3/CD38 a 0,5 mg/kg se realizó el día cero y el día siete. Los ratones tratados

con CD3/BCMA/CD38-118 fueron evaluados en ausencia de IVIG, mientras que los grupos tratados con Vehículo y BEAT CD3/CD38 fueron evaluados tanto en presencia como en ausencia de IVIG. El volumen del tumor se evaluó según la medición del tamaño del tumor con un calibrador tres veces por semana. El análisis ex vivo se realizó el día 11 (n = 3-5 ratones por grupo). Se extrajeron bazo y tumores y se realizó un análisis FACS. Este experimento se realizó una vez.

Estudio KMS_14. Aumento de la dosis de TREAT CD3/BCM A/CD38-118, BEAT CD3/CD38 y Teclistamab en tumores KMS-12-BM, en presencia de IVIG. A los ratones hembra NSG se les injertó sc con 1×10^7 células tumorales KMS-12-BM e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de un donante humano sano (Donante C) el mismo día (6-8 ratones por grupo; 10 grupos). Los ratones fueron aleatorizados basados en el volumen del tumor 8 días después del xenoinjerto y se les inyectó por vía intravenosa el mismo día (día -1) 200 mg/kg de IVIG (Privigen) y después una vez por semana durante 3 semanas (día -1, 6 y 13). La dosificación (iv) de vehículo, CD3/BCMA/CD38-118 y BEAT CD3/CD38 a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg y Teclistamab a 2,5, 0,5 y 0,1 mg/kg se realizó los días 0, 7 y 14 (una vez por semana durante 3 semanas). El volumen del tumor se evaluó según la medición del tamaño del tumor con un calibrador tres veces por semana. Se recogió suero de ratón el día

21 (1 semana después de la última dosis) para determinar la concentración mínima de la molécula usando un método ELISA de captura específico para cada molécula (consulte la sección de ensayo ELISA del material y los métodos).
5 Este experimento se realizó una vez.

Farmacocinética de los activadores de células T

Las concentraciones séricas de cada molécula se determinaron usando una prueba ELISA de captura de antígeno
10 específico. En resumen, una placa Meso Scale Discovery (MSD) de 96 pocillos (MSD, Ref. L15XA-3) se recubre durante la noche a 2-8 °C con el antígeno diana: proteína BCMA, His Tag (ACRO Biosystems, Ref. BCA-H522y) para CD3/BCMA/CD38-118 (a 2 µg/ml) y Teclistamab (a 1 µg/ml); o proteína CD38,
15 His Tag (ACRO Biosystems, Ref. CD8-H82E7) para BEAT CD3/CD38 (a 1 µg/ml). Al día siguiente, los sitios no específicos se saturan con regulador de bloqueo de caseína al 1 % (p/v) (Thermo Scientific, Ref. 37583) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). A continuación, el antígeno
20 diana inmovilizado en la superficie de la placa MSD de 96 pocillos se usa para capturar anticuerpos en las muestras de suero diluidas (estándares, controles de calidad y muestras de estudio) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detecta con un anticuerpo de
25 detección etiquetado con sulfo durante 1 hora a temperatura ambiente: Anti-ID CD38 etiquetado con sulfo (P1188:

GBR1342_a1D(9G7)_6B12, generado internamente) para CD3/BCMA/CD38-118 o IgG anti-ID CD3 biotinilada (P1362: GBR430a1D (SP34), generado internamente) + Streptavidin Sulfo-Tag (MSD, Ref. R32AD-1) para BEAT CD3/CD38 y
5 Teclistamab. Los pocillos se lavan entre todas las etapas con solución salina regulada con fosfato (PBS) suplementada con 0,1 % de Tween-20 (Sigma, Ref. P1379). La señal positiva se mide mediante una respuesta de electroquimioluminiscencia (ECL) generada después de la
10 adición de 2x MSD Read Buffer T (MSD, Ref. R92TC-2) usando un lector de placas MSD: el instrumento MSD aplica electricidad a los electrodos de la placa, lo que genera la emisión de luz por las etiquetas SULFO-TAG. Después se mide la intensidad de la luz a ~620 nm y es proporcional a la
15 concentración de anticuerpos en las muestras. Después, la concentración de anticuerpos en muestras desconocidas se interpola a partir de la curva de calibración usando un modelo de regresión de cuatro parámetros con ponderación 1/Y². Los datos se analizaron usando Excel y GraphPad Prism
20 9.

Preparación de las muestras para citometría de flujo

Los tumores se recolectaron y se disociaron con un cóctel enzimático del kit de disociación de tumores
25 humanos (Miltenyi Biotec, Ref. 130-095-929) en un disociador GentleMACS. Después, las suspensiones

celulares se filtraron usando un colador de células de 70 μm y se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante del tumor y se resuspendió el sedimento celular, se contaron las células y se ajustaron a 10×10^6 células/ml en PBS suplementado con FCS al 2 % (regulador FACS). Las suspensiones de células del bazo se obtuvieron machacándolas a través de un colador de células de nailon de 70 μm . Los glóbulos rojos (RBC) se lisaron con regulador de lisis de RBC (eBioscience, Ref. 00-4300-54) durante 4 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con RMPI 10 % FBS seguido de centrifugación. El sedimento celular se resuspendió, las células se contaron y se resuspendieron en regulador FACS a 10×10^6 células/ml. Después se tiñeron suspensiones de células tumorales y del bazo para determinar el perfil de células inmunes. En resumen, las suspensiones de células se incubaron con colorante de viabilidad, bloque Fc humano y de ratón durante 15 minutos a 4 °C en regulador FACS, seguido de tinción de superficie con cóctel de anticuerpos (o controles relativos) durante 30 minutos a 4 °C en regulador FACS. Las muestras se adquirieron en el instrumento Northern Lights (CYTEK) y los datos se analizaron usando FlowJo v10.7.2 y GraphPad Prism 9.

25 Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism 9. Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron usando un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional (para un día determinado) o bidireccional (para todos los días de tratamiento) con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. El porcentaje (%) de inhibición del crecimiento tumoral (TGI), una indicación de actividad antitumoral, se calculó como: $TGI (\%) = 100 \times (1 - T/C)$, donde T y C son el volumen tumoral medio de los grupos tratados y de control del vehículo, respectivamente, en un día determinado. Para los conjuntos de datos en los que los animales alcanzaron el tamaño máximo del tumor (1000 mm^3) antes del punto final del estudio, se usó la última observación realizada (LOCF) para mostrar los volúmenes del tumor en gráficos y calcular el porcentaje de TGI.

Resultados y conclusiones

Se evaluó la eficacia in vivo de CD3/BCMA/CD38-118 en comparación con BEAT CD3/CD38 y el anticuerpo de referencia biespecífico CD3xBCMA teclistamab (Pillarisetti K. et al., 2020) en varios niveles de dosis en un modelo de

xenoinjerto tumoral KMS-12-BM subcutáneo en ratones NSG en un entorno terapéutico. Las células tumorales de mieloma humano KMS-12-BM con bajos niveles de expresión de BCMA y CD38 se inyectaron por vía subcutánea (sc) en ratones NSG (1 x 10⁷ células). Paralelamente, se inyectaron PBMC humanas de un donante humano sano (Donante C) por vía intraperitoneal (ip) el mismo día (1 x 10⁷ células). Los ratones fueron aleatorizados 8 días después de la inyección de células tumorales cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 187 mm³ en varios grupos de tratamiento (día -1). Los tratamientos terapéuticos de CD3/BCMA/CD38-118 (a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg), BEAT CD3/CD38 y teclistamab (a 2,5, 0,5 y 0,1 mg/kg) se inyectaron por vía intravenosa (iv) al día siguiente y una vez por semana durante 3 semanas (día 0, 7 y 14).

Como se observó previamente, 12 días después del inicio del tratamiento, CD3/BCMA/CD38-118 indujo la regresión del tumor KMS-12-BM de manera dependiente de la dosis (Figura 44A, arriba), con 97,4 %, 76,5 % y 45,5 % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI, en comparación con el vehículo) en ratones tratados con dosis de 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con BEAT CD3/CD38 o teclistamab no logró controlar la progresión del tumor incluso en las dosis más altas (Figura 44A, medio e inferior). A 2,5 mg/kg, el TGI comparado con el vehículo fue -7,1 %

para BEAT CD3/CD38 y -4,6 % para teclistamab, sin mostrar diferencias en comparación con los ratones control (Tabla 47). Sorprendentemente, aunque no fue estadísticamente significativo en comparación con los ratones tratados con 5 vehículo, las dosis bajas (0,1 mg/kg) de BEAT CD3/CD38 y teclistamab mostraron una tendencia a una mayor eficacia en comparación con las dosis máximas (con 37 % y 19,8 % de TGI, respectivamente) (Figura 44A, Tabla 47).

A una dosis de 0,5 o 0,1 mg/kg, BEAT CD3/CD38 y 10 teclistamab no inhibieron significativamente el crecimiento de tumores KMS-12-BM en ratones NSG, mientras que CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia considerablemente mayor en ambas dosis (Figura 44B, Tabla 47).

Comparación de grupos	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif.,	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	230,5	125,4 a 335,6	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	176	70,94 a 281,1	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	104,5	-0,5785 a 209,6	ns	0,0527
Vehículo vs. a 2,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-27,52	-132,6 a 77,57	ns	0,9981
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	59,1	-45,98 a 164,2	ns	0,7436
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg BEAT CD3/CD38	61,83	-43,25 a 166,9	ns	0,69
Vehículo vs. a 2,5 mg/kg de Teclistamab	21,93	-83,16 a 127,0	ns	0,9997
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg de Teclistamab	19,05	-86,04 a 124,1	ns	>0,9999
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg de Teclistamab	67,69	-37,39 a 172,8	ns	0,5666
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-54,49	-159,6 a 50,59	ns	0,8241

0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-126	-231,1 a -20,93	**	0,006
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg de CD3/CD38 BEAT	-258	-363,1 a -153,0	****	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-171,4	-276,5 a -66,33	****	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg BEAT CD3/CD38	-168,7	-273,8 a -63,60	****	<0,0001
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-208,6	-313,7 a -103,5	****	<0,0001
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-211,5	-316,6 a -106,4	****	<0,0001
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-162,8	-267,9 a -57,74	****	<0,0001
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-71,52	-176,6 a 33,57	ns	0,4845
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-203,5	-308,6 a -98,46	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-116,9	-222,0 a -11,84	*	0,0159
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de CD3/CD38 BEAT	-114,2	-219,3 a -9,106	*	0,021
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-154,1	-259,2 a -49,02	***	0,0002
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-157	-262,1 a -51,89	***	0,0001
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-108,3	-213,4 a -3,248	*	0,0371
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-132	-237,1 a -26,94	**	0,003
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-45,4	-150,5 a 59,68	ns	0,9352
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg BEAT CD3/CD38	-42,67	-147,8 a 62,41	ns	0,9557
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-82,58	-187,7 a 22,50	ns	0,2726
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-85,46	-190,5 a 19,63	ns	0,228
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-36,82	-141,9 a 68,27	ns	0,9833
2,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38	86,62	-18,46 a 191,7	ns	0,2114
2,5 mg/kg de CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de CD3/CD38	89,35	-15,73 a 194,4	ns	0,1757
2,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	49,44	-55,64 a 154,5	ns	0,8941
2,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	46,57	-58,52 a 151,7	ns	0,9247
2,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	95,21	-9,875 a 200,3	ns	0,1142
0,5 mg/kg de CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de CD3/CD38	2,73	-102,4 a 107,8	ns	>0,9999

0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-37,18	-142,3 a 67,91	ns	0,9822
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-40,06	-145,1 a 65,03	ns	0,9705
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	8,587	-96,50 a 113,7	ns	>0,9999
0,1 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-39,91	-145,0 a 65,18	ns	0,9712
0,1 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-42,79	-147,9 a 62,30	ns	0,955
0,1 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	5,858	-99,23 a 110,9	ns	>0,9999
2,5 mg/kg de Teclistamab vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-2,877	-108,0 a 102,2	ns	>0,9999
2,5 mg/kg de Teclistamab vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	45,77	-59,32 a 150,9	ns	0,932
0,5 mg/kg de Teclistamab vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	48,64	-56,44 a 153,7	ns	0,9033

Tabla 47. Análisis estadístico de la Figura 43 (A, B). Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 8 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las concentraciones séricas de las tres moléculas se determinaron el día 13/14, antes de una tercera dosis, o una semana después (día 21). La dosis (5 veces) a los niveles de exposición (6 a 11 veces) fue relativamente lineal para la mayoría de las dosis y moléculas, excepto para CD3/BCMA/CD38-118 a 0,02 mg/kg (Figura 44C), como se observó anteriormente. En dosis correspondientes, las concentraciones mínimas séricas fueron similares en todos

los grupos de tratamiento. Como tal, la disminución de la eficacia de BEAT CD3/CD38 y teclistamab no pudo explicarse por diferencias en la farmacocinética, ya que se observaron niveles mínimos similares en ratones tratados con
5 CD3/BCMA/CD38-118 (Figura 44).

Para investigar la causa de la falta de eficacia in vivo de BEAT CD3/CD38 y teclistamab en este modelo, se realizó un perfil de células inmunes el día 13 en tumores y bazos de ratones de grupos seleccionados (n = 2-3
10 ratones/grupo) (Figura 45). Se eligieron dosis altas (sin control del tumor) y dosis bajas (con una tendencia a una mejor eficacia) de ambas moléculas, mientras que solo se seleccionó un único ratón tratado con dosis baja para CD3/BCMA/CD38-118, ya que los tumores se habían eliminado
15 con todas las demás dosis y la regresión completa representa una alta eficacia en este momento para esta molécula. El análisis FACS demostró una disminución tanto de los leucocitos humanos totales (CD45+) como de las células T humanas (TCR $\alpha\beta$ ⁺) por gramo de tumor en ratones
20 tratados con 2,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 y teclistamab, en comparación con el vehículo, los ratones tratados con CD3/BCMA/CD38-118 o los ratones tratados con dosis bajas (0,1 mg/kg) de las mismas moléculas (Figura 45A, B, C). Se observaron datos similares para las dosis altas de
25 BEAT CD3/CD38 y teclistamab en el bazo (Figura 45D). Se pudo observar una reducción de 3000 ~ veces en el

compartimento de células T periféricas en comparación con los ratones tratados con el vehículo, lo que cuando se toma con los niveles reducidos de células T observados en el tumor es consistente con el agotamiento de células T in vivo. Dosis más bajas de BEAT CD3/CD38 y teclistamab no indujeron la disminución de las células T infiltradas en el tumor (Figura 45C), con baja eficacia (Figura 44A) y persistencia de las células T atribuida a la baja exposición (Figura 44C).

CD3/BCMA/CD38-118 contiene mutaciones que silencian completamente Fc (LALA-P329A) (Schlothauer T. et al., 2016), por lo que carece de interacciones con el receptor Fc/Fcγ (FcγR) y, en consecuencia, de funciones efectoras mediadas por FcγR. Sin embargo, la porción Fc tanto de BEAT CD3/CD38 (IgG1) como de teclistamab (IgG4) está solo parcialmente silenciada (mutación LALA) (Pillarisetti K. et al., 2020), lo que potencialmente permite una actividad residual mediada por Fc. Junto con los datos anteriores, esto sugiere que la falla del control tumoral de BEAT CD3/CD38 y teclistamab podría ser causada por el agotamiento de células T como resultado de la actividad residual de Fc. La dependencia de la dosis de tratamiento y de los anticuerpos de la depleción de células T infiltrantes del tumor es consistente con esta explicación y la falta de depleción con CD3/BCMA/CD38-118 implica la actividad residual de Fc.

Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que el tratamiento previo con inmunoglobulina intravenosa (IVIG), que comprende anticuerpos IgG humanos agrupados del suero de donantes sanos, podría generar competencia por la unión a FcγR en los macrófagos, evitando la unión al anticuerpo del tratamiento y la consiguiente toxicidad mediada por Fc.

Para corroborar esta hipótesis, se realizó un experimento comparando la eficacia de BEAT CD3/CD38 en presencia o ausencia de IVIG in vivo. A los ratones hembra NSG se les injertó sc con 1×10^7 células tumorales KMS-12-BM e inoculadas ip con 1×10^7 PBMC de un donante humano sano (Donante E) el mismo día. Los ratones fueron aleatorizados 8 días después cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 120 mm^3 en varios grupos de tratamiento (día -1) y se inyectaron iv el mismo día con 200 mg/kg de IVIG (Privigen) o PBS y después dos veces por semana. La dosificación (iv) del vehículo, CD3/BCM A/CD38-118 a 0,5 mg/kg o BEAT CD3/CD38 a 0,5 mg/kg se realizó el día 0 y 7. Los ratones tratados con CD3/BCMA/CD38-118 fueron evaluados en ausencia de IVIG, mientras que los grupos tratados con Vehículo y BEAT CD3/CD38 fueron evaluados tanto en presencia como en ausencia de IVIG.

No se observaron diferencias estadísticas en el volumen del tumor en ratones tratados con vehículo con o sin pretratamiento de IVIG in vivo (Figura 46A, B; Tabla

48), que muestra que la IVIG no afecta la cinética del crecimiento del tumor KMS-12-BM. En presencia de IVIG, el tratamiento con BEAT CD3/CD38 indujo una regresión tumoral de manera similar a CD3/BCMA/CD38-118 (Figura 46A, Tabla 5 48), con un 93,1 % y un 90,8 % de inhibición del crecimiento tumoral el día 11, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con BEAT CD3/CD38 sin IVIG no inhibió significativamente el crecimiento de los tumores KMS-12-BM en ratones NSG en comparación con los ratones 10 tratados con vehículo (Figura 46A, B; Tabla 48 y Tabla 49), como se observó anteriormente.

Comparación de grupos	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif.,	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. Vehículo + MG	39,75	-31,86 a 111,4	ns	0,5431
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	159,7	84,78 a 234,6	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	44,1	-27,51 a 115,7	ns	0,437
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38+ IVIG	175	103,4 a 246,6	****	<0,0001
Vehículo + IVIG vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	119,9	54,14 a 185,7	****	<0,0001
Vehículo + IVIG vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	4,349	-57,67 a 66,37	ns	0,9997
Vehículo + 1 VIG vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38+ IVIG	135,3	73,26 a 197,3	****	<0,0001
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de CD3/CD38 BEAT	-115,6	-181,3 a -49,79	****	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38+ IVIG	15,36	-50,42 a 81,14	ns	0,9674
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38+ IVIG	130,9	68,91 a 192,9	****	<0,0001

5 Tabla 48. Análisis estadístico de la Figura 46 (A). Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 3-5 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Comparación de grupos	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif.,	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. Vehículo + IVIG	86,23	-345,0 a 517,5	ns	0,9718
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	729,5	278,5 a 1181	**	0,0011
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	130,6	-300,6 a 561,9	ns	0,8847
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38+ IVIG	747,9	316,6 a 1179	***	0,0005
Vehículo + IVIG vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	643,3	247,2 a 1039	**	0,001
Vehículo + IVIG vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	44,38	-329,1 a 417,8	ns	0,996
Vehículo + IVIG vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38+ IVIG	661,6	288,2 a 1035	***	0,0004
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de CD3/CD38 BEAT	-598,9	-995,0 a -202,8	**	0,0021
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38+ IVIG	18,32	-377,8 a 414,4	ns	>0,9999
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38+ IVIG	617,2	243,8 a 990,7	***	0,0009

10

Tabla 49. Análisis estadístico de la Figura 46 (B). Las diferencias en el volumen del tumor en el día 11 (punto final del estudio) se determinaron usando un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con prueba de comparación

múltiple de Tukey, n = 3-5 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Se realizó citometría de flujo en tumores y bazo para evaluar el grado de infiltración de células inmunes humanas en presencia/ausencia de IVIG (Figura 46C, D). El día 11, se observó una reducción de 10 ~ veces en las células T infiltradas en el tumor (en comparación con CD3/BCMA/CD38-118) y una reducción de ~60 veces en el compartimento de células T periféricas (en comparación con el vehículo) en ratones tratados con BEAT CD3/CD38 sin IVIG, lo que indica un agotamiento de las células T y corrobora resultados anteriores. Sin embargo, cuando los ratones fueron tratados previamente con IVIG, el tratamiento con BEAT CD3/CD38 aumentó la infiltración de células T en el microambiente tumoral de manera similar a CD3/BCMA/CD38-118 (Figura 46D). Además, el compartimento de células T periféricas se rescató parcialmente tras la administración de BEAT CD3/CD38+ IVIG (Figura 46D (continuación)).

En conclusión, la IVIG rescató el compartimento de células T y restauró la eficacia in vivo de BEAT CD3/CD38. Este innovador pretratamiento con IVIG en ratones humanizados parece generar competencia por la

activación del receptor y evitar el agotamiento de las células T por un anticuerpo mayoritariamente silencioso, lo que proporciona un mejor modelado de la situación clínica. Este método permitirá así un mejor modelado preclínico de los activadores de células T y la comparación directa de anticuerpos con diferentes regiones Fc/mutaciones in vivo.

A continuación, reevaluamos la eficacia in vivo de CD3/BCMA/CD38-118, BEAT CD3/CD38 y teclistamab contra tumores KMS-12-BM en presencia de IVIG (Figura 47). Las células tumorales de mieloma humano KMS-12-BM con bajos niveles de expresión de BCMA y CD38 se inyectaron por vía subcutánea (sc) en ratones NSG (1×10^7 células). Paralelamente, se inyectaron PBMC humanas de un donante humano sano (Donante C) por vía intraperitoneal (ip) el mismo día (1×10^7 células). Los ratones fueron aleatorizados 8 días después de la inyección de células tumorales cuando el volumen tumoral promedio alcanzó 147 mm^3 y se les inyectó por vía intravenosa el mismo día (día -1) 200 mg/kg de IVIG (Privigen) y después una vez por semana durante 3 semanas (día -1, 6 y 13). La dosificación (iv) de vehículo, CD3/BCMA/CD38-118 y BEAT CD3/CD38 a 0,5, 0,1 y 0,02 mg/kg y Teclistamab a 2,5, 0,5 y 0,1 mg/kg se realizó los días 0, 7 y 14 (una vez por semana durante 3 semanas).

CD3/BCMA/CD38-118, BEAT CD3/CD38 y teclistamab
pudieron controlar los tumores KMS-12-BM de manera
dependiente de la dosis (Figura 47 A). CD3/BCMA/CD38-118
provocó una regresión tumoral completa en los 8 ratones
5 (8/8, 100 % TGI) cuando se administró a dosis de 0,5 y
0,1 mg/kg y solo mostró una eficacia parcial,
estadísticamente significativa, del 36,5 % TGI a una dosis
de 0,02 mg/kg. BEAT CD3/CD38 provocó una regresión tumoral
completa en los ocho ratones (8/8, 100 % TGI) cuando se
10 administró una dosis de 0,5 mg/kg y una inhibición
significativa del crecimiento tumoral del 77,6 % con una
dosis de 0,1 mg/kg, con 3 (de 7) regresiones completas. A
una dosis de 0,02 mg/kg mostró una inhibición
significativa del crecimiento tumoral del 39,4 %.
15 Teclistamab administrado a una dosis de 2,5 mg/kg provocó
la regresión completa de 5/8 tumores con un TGI del
88,3 %. A una dosis de 0,5 mg/kg, teclistamab mostró una
inhibición del crecimiento tumoral del 90,7 % y un TGI del
30,8 % con la dosis más baja probada, 0,1 mg/kg. Las
20 estadísticas se resumen en la Tabla 50.

Al comparar las tres moléculas evaluadas a
0,5 mg/kg no se observaron diferencias estadísticas, con
100 % de TGI para CD3/BCMA/CD38-118 y BEAT CD3/CD38 y
90,7 % para teclistamab (Figura 47B, izquierda; Tabla
25 50). Sin embargo, a una dosis de 0,1 mg/kg,
CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia in vivo

estadísticamente mayor en comparación con BEAT CD3/CD38 y en un grado aún mayor en comparación con teclistamab (Figura 47B, derecha; Tabla 50). Con esta dosis, se observó una regresión tumoral completa en el 100 % de los ratones (100 % TGI) para CD3/BCMA/CD38-118; en el 43 % de los ratones (77,6 % TGI) para BEAT CD3/CD38 y en el 0 % de los ratones (30,8 % TGI) para teclistamab, que mostró solo una eficacia parcial.

Comparación de grupos	Dif. media. (mm ³)	95,00 % de CI de dif.,	Síntesis	Valor P ajustado
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	583,8	489,3 a 678,3	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	594,9	500,4 a 689,4	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118	259,6	165,1 a 354,1	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	564,9	470,4 a 659,4	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg BEAT CD3/CD38	444,5	346,7 a 542,3	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,02 mg/kg BEAT CD3/CD38	178,9	76,84 a 281,0	****	<0,0001
Vehículo vs. a 2,5 mg/kg de Teclistamab	506,3	411,8 a 600,8	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,5 mg/kg de Teclistamab	519,8	422,0 a 617,6	****	<0,0001
Vehículo vs. a 0,1 mg/kg de Teclistamab	189,8	91,94 a 287,6	****	<0,0001
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	11,12	-83,38 a 105,6	ns	>0,9999
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-324,2	-418,7 a -229,7	****	<0,0001
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-18,91	-113,4 a 75,58	ns	0,9998
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg BEAT CD3/CD38	-139,3	-237,1 a -41,44	***	0,0003
0,5 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg BEAT CD3/CD38	-404,9	-506,9 a -302,8	****	<0,0001
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-77,49	-172,0 a 17,00	ns	0,2183
0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-63,96	-161,8 a 33,86	ns	0,5461

0,5 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-394	-491,8 a -296,2	****	<0,0001
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118	-335,3	-429,8 a -240,8	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	-30,03	-124,5 a 64,47	ns	0,9918
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de CD3/CD38 BEAT	-150,4	-248,2 a -52,56	****	<0,0001
0,1 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg BEAT CD3/CD38	-416	-518,1 a -313,9	****	<0,0001
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-88,61	-183,1 a 5,888	ns	0,0878
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-75,07	-172,9 a 22,74	ns	0,3063
0,1 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-405,1	-503,0 a -307,3	****	<0,0001
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg BEAT CD3/CD38	305,3	210,8 a 399,8	****	<0,0001
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg BEAT CD3/CD38	185	87,16 a 282,8	****	<0,0001
0,02 mg/kg CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,02 mg/kg BEAT CD3/CD38	-80,65	-182,7 a 21,41	ns	0,2661
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	246,7	152,2 a 341,2	****	<0,0001
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	260,3	162,5 a 358,1	****	<0,0001
0,02 mg/kg de CD3/BCMA/CD38-118 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-69,8	-167,6 a 28,01	ns	0,4137
0,5 mg/kg de CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de CD3/CD38	-120,3	-218,2 a -22,53	**	0,0041
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,02 mg/kg de BEAT CD3/CD38	-386	-488,0 a -283,9	****	<0,0001
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	-58,58	-153,1 a 35,92	ns	0,6227
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	-45,04	-142,9 a 52,77	ns	0,9069
0,5 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-375,1	-472,9 a -277,3	****	<0,0001
0,1 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,02 mg/kg de BEAT CD3/CD38	-265,6	-370,8 a -160,5	****	<0,0001
0,1 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	61,76	-36,05 a 159,6	ns	0,5968
0,1 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	75,3	-25,72 a 176,3	ns	0,3485
0,1 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-254,8	-355,8 a -153,8	****	<0,0001
0,02 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 2,5 mg/kg de Teclistamab	327,4	225,3 a 429,5	****	<0,0001
0,02 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	340,9	235,8 a 446,1	****	<0,0001
0,02 mg/kg de BEAT CD3/CD38 vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	10,85	-94,30 a 116,0	ns	>0,9999

2,5 mg/kg de Teclistamab vs. 0,5 mg/kg de Teclistamab	13,54	-84,28 a 111,4	ns	>0,9999
2,5 mg/kg de Teclistamab vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-316,5	-414,4 a -218,7	****	<0,0001
0,5 mg/kg de Teclistamab vs. 0,1 mg/kg de Teclistamab	-330,1	-431,1 a -229,1	****	<0,0001

Tabla 50. Análisis estadístico de la Figura 47 (A, B). Las diferencias en el volumen del tumor se determinaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de Tukey, n = 6-8 ratones por grupo. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, y el nivel de significancia se representó mediante asteriscos de la siguiente manera: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las concentraciones séricas se determinaron el día 21 (1 semana después de la última dosis) usando los mismos métodos ELISA anteriores, excluyendo cualquier animal que alcanzó el tamaño máximo del tumor antes de ese momento. Sin embargo, la presencia in vivo de I VI G afecta la vida media de la molécula (al menos para CD3/BCMA/CD38-118; no se muestra) y las concentraciones mínimas cayeron por debajo del límite de cuantificación para las dosis de tratamiento más bajas (Figura 47C). Además, en comparación con las exposiciones mínimas en ausencia de IVIG (Figura 44C), la dosis (5 veces) a los niveles de exposición (17 veces) ya no fueron lineales entre las dosis del tratamiento (Figura 47C). A una dosis de 0,5 mg/kg, los datos farmacocinéticos mostraron concentraciones mínimas

relativamente similares de CD3/BCMA/CD38-118 y BEAT CD3/CD38 con exposiciones modestamente inferiores a teclistamab (Figura 47C). Por otra parte, a 0,1 mg/kg no se pudieron cuantificar los niveles mínimos de exposición de
5 BEAT CD3/CD38 y teclistamab (Figura 47C). Como tal, las diferencias de potencia observadas en esta dosis (0,1 mg/kg; Figura 47B) no se puede correlacionar con las concentraciones mínimas del suero.

En resumen, cuando se comparó en un modelo
10 clínicamente relevante (con IVIG), CD3/BCMA/CD38-118 mostró una potencia superior al anticuerpo biespecífico CD3xBCMA aprobado clínicamente teclistamab (Pillarisetti K. et al., 2020) cuando se usó como tratamiento terapéutico en un modelo de xenoinjerto de mieloma humano
15 en ratones NSG. En comparación con BEAT CD3/CD38, las diferencias fueron menores y CD3/BCMA/CD38-118 solo mostró una eficacia in vivo significativamente mejor en comparación con BEAT CD3/CD38 a 0,1 mg/kg, lo que sugiere que la orientación simultánea de BCMA y CD38 puede
20 aumentar la capacidad de muerte de tumores in vivo, incluso contra células tumorales con baja expresión de BCMA y CD38.

Ejemplo 24: Ensayo de competencia de CD3/BCMA/CD38-118 con
25 isatuximab y daratumumab mediante interferometría BioLayer

Materiales y métodos:

La competencia de CD3/BCMA/CD38-118 con isatuximab y daratumumab para unirse a CD38 humano se evaluó usando interferometría de biocapa de octetos. Las mediciones se realizaron en un instrumento OctetRED96e (Sartorius) y se analizaron mediante el uso del software de análisis de datos, versión 11.1 (Sartorius). Proteína CD38-avi-his humana recombinante biotinilada (Acrobiosystems, cat.nb. CD8-H82E7) se cargó a 1 µg/ml en regulador cinético (Sartorius, cat. núm.: 18-1105) durante 5 minutos en un Biosensor SA de estreptavidina (Sartorius, cat. núm.: 18-5019). Después, el biosensor cargado con CD38 se sumergió en una solución saturada de isatuximab (sec. con núm. de ident.: 569 y sec. con núm. de ident.: 570) o de daratumumab (Darzalex®, Janssen) a 200 nM durante 10 minutos, seguido de una inmersión sucesiva en una solución mixta de 200 nM de isatuximab y 200 nM de CD3/BCMA/CD38-118, o en una solución mixta de 200 nM de daratumumab y 200 nM de CD3/BCMA/CD38-118 durante 10 minutos. Como control de la saturación de la superficie del biosensor cargado con CD38 con isatuximab o daratumumab, se realizó el mismo procedimiento experimental con una segunda inmersión en una solución de 400 nM de isatuximab o de 400 nM de daratumumab, respectivamente. Se inmovilizaron biosensores de estreptavidina frescos con CD38 humano biotinilado antes

de cada ciclo. Todas las etapas se realizaron a 25 °C y 1000 RPM de agitación.

Resultados y conclusiones

5 Para evaluar si CD3/BCMA/CD38-118 aún podía unirse a CD38 humano (hsCD38) previamente saturado con isatuximab o con daratumumab, usamos interferometría de biocapa. Como se muestra en la Figura 48A, después de saturar la proteína CD38 humano recombinante con
10 isatuximab, CD3/BCMA/CD38-118 no pudo unirse a la proteína CD38 humano recombinante, como lo demuestra la ausencia de aumento en la señal visible tras la carga de CD3/BCMA/CD38-118, en presencia de Isatuximab. Por otra parte, como se muestra en la Figura 48B, después de
15 saturar la proteína CD38 humano recombinante con daratumumab, CD3/BCMA/CD38-118 todavía pudo unirse a hsCD38, como lo demuestra el aumento de la señal visible tras la carga de CD3/BCMA/CD38-118.

20 Ejemplo 25: La colocación de aglutinantes en los anticuerpos CD3/BCMA/CD38 permite optimizar la potencia y reducir la actividad fuera del tumor.

Materiales y métodos

25

Generación de moléculas de control adicionales

CD3/BCMA/CD38-118 está en la configuración BO, por lo que el aglutinante CD3 está en la posición distal Fc del brazo B del constructo BEAT, el aglutinante BCMA está en la posición proximal Fc del brazo B y el aglutinante CD38 está en el brazo A del constructo BEAT (Figura 9A). Para evaluar si la posición de los aglutinantes de antígeno asociado a tumores (TAA) en relación con el aglutinante CD3 puede afectar la potencia de muerte del tumor o la activación de células T fuera del tumor, se produjeron moléculas de control adicionales de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 3 y de acuerdo con las combinaciones de secuencias detalladas en la Tabla 51. CD3/BCMA/CD38-170 usa los mismos brazos de unión Fab que CD3/BCMA/CD38-118 pero las posiciones de BCMA y CD38 están invertidas (Figura 49). Se generaron controles adicionales que usaron un aglutinante irrelevante, denominado G6DU, en lugar de Fabs de unión específicos y que mostraron la misma disposición alternativa de los aglutinantes dentro del anticuerpo triespecífico como se detalla en la Tabla 52.

CD3/BCMA/CD38-	Cadena 1	Cadena 2	Cadena 3
170	Sec. con núm. de ident.: 727	Sec. con núm. de ident.: 728	Sec. con núm. de ident.: 1
171	Sec. con núm. de ident.: 528	Sec. con núm. de ident.: 728	Sec. con núm. de ident.: 1
172	Sec. con núm. de ident.: 727	Sec. con núm. de ident.: 555	Sec. con núm. de ident.: 1

Tabla 51: Combinación en cadena de anticuerpos de control
CD3/BCMA/CD38 adicionales

Ensayo RDL con células T y células tumorales de mieloma

5 múltiple KMS-12-BM

Se evaluaron los anticuerpos CD3/BCMA/CD38-118 (previamente descrito en el Ejemplo 9), -149, -151 (previamente descrito en el Ejemplo 22a), -170, -171 y -172 para determinar la potencia de muerte citotóxica de la
10 línea celular MM KSM-12-BM. El ensayo RDL se realizó como se describe en el Ejemplo 22f, excepto que los experimentos se llevaron a cabo con un rango de dosis que comenzó en 200 nM seguido de diluciones seriadas de 10 veces. El porcentaje de citotoxicidad tumoral se determinó midiendo
15 el porcentaje de células diana muertas. Los porcentajes de citotoxicidad se graficaron y ajustaron usando un modelo logístico no lineal 4PL con pendiente variable. Para la comparación estadística se usó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Se
20 realizaron dos experimentos independientes con un total de seis donantes.

Actividad fuera del tumor en la diana

Se evaluaron los anticuerpos CD3/BCMA/CD38-118,
25 149, 151, 170, 171 y 172 para la activación de células T fuera del tumor en un ensayo de PBMC de alta densidad. El

ensayo se realizó como se describe en el ejemplo 13, excepto que los experimentos se llevaron a cabo usando un rango de dosis que comenzó en 20 nM seguido de diluciones seriadas de 5 veces. Se graficó el porcentaje de células T CD8+ que expresaban CD25 y se ajustó usando un modelo logístico no lineal 4PL con pendiente variable. Para la comparación estadística se usó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Se realizaron dos experimentos independientes con un total de seis donantes.

Resultados y conclusiones

Los anticuerpos de control se diseñaron y produjeron con éxito en células CHO-S con porcentajes de pureza que oscilaron entre el 97 y el 98 %, medido por SE-HPLC (Tabla 52).

CD3/BCMA/CD38-	170	171	172
Formato	D	D	D
Aglutinante CD3	C1-D6	C1-D6	C1-D6
Aglutinante CD38	B3-C11	B3-C11	G6DU
Aglutinante BCMA	E6-G6-N82aS	G6DU	E6-G6-N82aS
Pureza final (% de monómero)	98	97	98

Tabla 52: Descripción y caracterización de anticuerpos de control CD3/BCMA/CD38 adicionales (figura 49) usados para caracterizar aún más las moléculas principales CD3/BCMA/CD38.

5 Los anticuerpos de control recién generados (CD3/BCMA/CD38-170, -171 y -172) se compararon en un ensayo RDL y en un ensayo HD-PBMC con constructos anteriores (CD3/BCMA/CD38-118, -149 y -151).

10 Para evaluar el impacto de la posición del aglutinante CD38 en relación con el aglutinante CD3, se compararon los anticuerpos de control con el aglutinante CD38 distal o proximal al aglutinante CD3 y sin el aglutinante BCMA (CD3/BCMA/CD38-171 (Figura 49) versus CD3/BCMA/CD38-149 (Figura 9A), respectivamente).

15 Como se muestra en la Figura 50A, el anticuerpo de control con el aglutinante CD38 proximal al aglutinante CD3 (CD3/BCMA/CD38-171, configuración D) desencadenó una citotoxicidad de células tumorales estadísticamente mayor en comparación con el anticuerpo de control con el
20 aglutinante CD38 distal al aglutinante CD3 (CD3/BCMA/CD38-149).

 La activación de células T fuera del tumor en la diana, medida por la regulación positiva de CD25 en células T CD8+ en un ensayo HD-PBMC, también fue estadísticamente
25 mayor para el anticuerpo de control con el aglutinante CD38 proximal al aglutinante CD3 (CD3/BCMA/CD38-171) en

comparación con el anticuerpo de control con el aglutinante CD38 distal al aglutinante CD3 (CD3/BCMA/CD38-149) (Figura 51A).

También se evaluaron la potencia de muerte de tumores y la activación de células T fuera del tumor en la diana para los anticuerpos de control con el aglutinante BCMA distal o proximal al aglutinante CD3 y sin el aglutinante CD38 (CD3/BCMA/CD38-151 (Figura 9A) versus CD3/BCMA/CD38-172 (Figura 49), respectivamente). El anticuerpo de control con el aglutinante BCMA proximal al aglutinante CD3 (CD3/BCMA/CD38-151) indujo una citotoxicidad tumoral significativamente mayor que el anticuerpo de control con el aglutinante BCMA distal al aglutinante CD3 (CD3/BCMA/CD38-172, configuración D) (Figura 50B). Sin embargo, la activación de células T fuera del tumor en la diana, medida por la regulación positiva de CD25 en células T CD8⁺ en el ensayo HD-PBMC fueron muy bajas para ambos anticuerpos que carecían del aglutinante CD38 (Figura 51B).

Para entender si la disposición espacial de los aglutinantes en el anticuerpo triespecífico CD3/BCMA/CD38-118 (Figura 9A) confiere el equilibrio óptimo entre potencia y actividad fuera del tumor en la diana, se produjo otra configuración de CD3/BCMA/CD38-118, en la que los aglutinantes CD38 y BCMA se han invertido (CD3/BCMA/CD38-170 (Figura 49)) y ambos anticuerpos se

evaluaron para determinar su potencia de muerte de tumores y la activación de células T fuera del tumor en la diana. El anticuerpo CD3/BCMA/CD38-118 y el anticuerpo CD3/BCMA/CD38-170 invertido mostraron una potencia de muerte de tumores en general similar (Figura 50C). Sin embargo, el anticuerpo CD3/BCMA/CD38-170, en el que el aglutinante CD38 es proximal y el aglutinante BCMA es distal al aglutinante CD3, indujo una activación de células T fuera del tumor en la diana significativamente mayor en comparación con el anticuerpo CD3/BCMA/CD38-118 (Figura 51C).

En conjunto, estos datos demostraron que un constructo de anticuerpo con el aglutinante CD38 proximal al aglutinante CD3 en un constructo de anticuerpo aumenta tanto la potencia de muerte del tumor como la activación de células T fuera del tumor en la diana en comparación con un anticuerpo en el que el aglutinante CD38 está distal al aglutinante CD3. La posición del aglutinante BCMA proximal al aglutinante CD3 también aumentó la potencia para destruir el tumor. La activación de células T fuera del tumor en la diana fue baja para las moléculas de control con aglutinantes CD3 y BCMA pero carentes de un aglutinante CD38, probablemente debido al menor número de PBMC que expresan BCMA en comparación con CD38. Finalmente, la posición específica de los aglutinantes en CD3/BCMA/CD38-118 confirió una potencia de muerte tumoral similar y una

actividad fuera del tumor en la diana menor, en comparación con el anticuerpo CD3/BCMA/CD38-170 invertido.

Para los constructos triespecíficos CD3/BCMA/CD38, el dominio de unión con la mayor actividad esperada fuera del tumor (el dominio de unión CD38, debido a su expresión en las células inmunes) debe ubicarse más lejos (o distal) del dominio de unión CD3 y el dominio de unión con los menores efectos esperados fuera del tumor (el dominio de unión BCMA) debe ubicarse en una ubicación más cercana (o proximal) al dominio de unión CD3.

Ejemplo 26: Mapeo de epítomos para CD38 dirigidos por Fab de anti-CD38-B3 mediante cristalografía de rayos X.

El presente ejemplo presenta la estructura cristalina resuelta del Fab de anti-CD38-B3 (sec. con núm. de ident.: 110 y sec. con núm. de ident.: 1) unido al antígeno CD38 humano recombinante (sec. con núm. de ident.: 729) con una resolución de 3,4 Å.

Materiales y métodos

Producción del antígeno CD38

Síntesis y clonación de genes

ADNc que codifica el dominio extracelular de CD38 humano (hsCD38) (ECD, residuos de aminoácidos Arg45-11e300 de la entrada P28907 de Uniprot), que contiene las siguientes mutaciones diseñadas para mover los cuatro
5 sitios de glicosilación ligados a N (N100D, N164A, N209D y N219D); El ECD se fusionó a una etiqueta de péptido de 6 histidinas C-terminal, se sintetizó y se clonó en un vector derivado de pcDNA3.1 (Invitrogen). El vector de expresión también lleva un promotor de CMV, una
10 poliadenilación (poli(A)) de hormona bovina, el origen de replicación del plásmido del virus de Epstein-Barr (oriP), y el péptido líder VJ2C murino para la secreción de la cadena de polipéptido codificada.

15 Expresión y purificación de proteínas

El ECD CD38 del Homo sapiens (hs) se expresó en células Expi293F™ (ThermoFisher) cultivadas en medio de expresión Expi293 (Thermo Fisher). El día anterior a la transfección, las células se centrifugaron durante 10
20 minutos a 900 rpm y se resuspendieron en medio de expresión Expi293 fresco hasta una concentración final de 2×10^6 células viables/ml. Al día siguiente, las células se diluyeron hasta una densidad final de $2,5 \times 10^6$ células viables/ml y transfectadas con una mezcla de reactivo de
25 transfección DNA-ExpiFectamine™ 293 (ThermoFisher) usando 1 µg de ADN y 2,7 µl de agente de transfección por 1 ml de

cultivo. Normalmente, el ADN y ExpiFectamine™ se diluyen con un 5 % del volumen de cultivo final de regulador de complejación Opti-Plex™ (ThermoFisher), se mezclan suavemente mediante agitación y los reactivos individuales se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. El reactivo ExpiFectamine™ 293 diluido se añade suavemente al ADN plasmídico diluido y el complejo se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, el complejo se transfiere a las células y las células se incuban en una plataforma de agitación orbital a 37 °C con 8 % de CO₂. 18-22 horas después de la transfección, las células se suplementan con ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 1 y ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 2 (ThermoFisher) usando un volumen correspondiente al 0,5 % y al 5 % del volumen de cultivo final para el Enhancer 1 y el Enhancer 2, respectivamente. Cinco días después de la transfección, el sobrenadante de cultivo libre de células que contenían la proteína recombinantes se prepararon mediante centrifugación seguida de filtración, y se usaron para purificación adicional.

Para la purificación de hsCD38, el sobrenadante aclarado que contenía la proteína de interés se cargó en una columna HisTrap™ Excel de 5 ml (Cytiva) equilibrada con PBS pH 7.4 a 10 ml/min usando un sistema FPLC puro Fkta™ (Cytiva). Después, la columna se lavó con 7 volúmenes de columna de PBS pH 7.4 a 5 ml/min y la proteína se eluyó con

un gradiente de 4 etapas con 5 %, 20 %, 50 % y 100 % de regulador de elución compuesto de PBS pH 7.4 y 500 mM de imidazol, cada etapa ejecutándose sobre 7 volúmenes de columna. Las fracciones pico se agruparon y concentraron usando un dispositivo de filtro centrífugo Centricon® (Merck Millipore) equipado con una membrana de corte de 10 kDa. La muestra concentrada se purificó aún más mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un HiLoad Superdex-200 26/600 (Cytiva) ejecutado a 2,8 ml/min y PBS pH 7.4.

Generación de Fab de anti-CD38-B3

Síntesis y clonación de genes

Para la expresión del Fab de anti-CD38-B3 (sec. con núm. de ident.: 110 y sec. con núm. de ident.: 1), se construyeron vectores de cadena pesada y ligera como se describió anteriormente en el Ejemplo 5. Brevemente, los ADNc que codifican la región de la cadena pesada variable se amplificaron mediante PCR usando el clon scFv en su vector de genoteca de fagos. El producto de PCR VH se clonó en el vector pcDNA 3.1 modificado aguas arriba de un ADNc que codifica un dominio CHI de cadena pesada de IgG1 humana. La cadena ligera fija Vk3-15/Jk1 (sec. con núm. de ident.: 1) se clonó en el vector pcDNA 3.1

modificado aguas arriba de un ADNc que codifica un dominio de cadena ligera constante kappa humana.

Expresión y purificación de proteínas

5 Para la expresión de Fab, se cotransfectaron cantidades iguales de vectores de cadena pesada y cadena ligera en células Expi293F™ (ThermoFisher). Después se realizó la expresión como se describió anteriormente para el ECD CD38 humano. Cinco días después de la transfección, el sobrenadante de cultivo libre de células que contenían la proteína recombinantes se prepararon mediante centrifugación seguida de filtración, y se usaron para purificación adicional.

15 Para la purificación, el sobrenadante aclarado que contenía la proteína de interés se cargó en una columna CaptureSelect™ CH1-XL (Thermo Scientific™) equilibrada con PBS pH 7.4. Después, Fab se eluyó con glicina 0,1 M pH 3.5. Después de la neutralización con 1/10 del volumen de Tris-HCl pH 8.0, el eluato se purificó aún más mediante SEC usando un HiLoad Superdex-200 16/600 (Cytiva) equilibrado en PBS pH 7.4.

Cristalización y determinación de la estructura del complejo B3/CD38

25 Para la cristalización, el complejo de hsCD38 con el Fab de anti-CD38-B3 se formó mezclando el receptor con

un exceso de Fab de 1,3 veces seguido de purificación por SEC usando un HiLoad Superdex-200 16/600 (Cytiva) equilibrado en 25 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl. El complejo Fab/hsCD38 se concentró a ~ 11 mg/ml. Los cristales usados para la recolección de datos fueron cultivados mediante el método de difusión de vapor con gota sentada con una solución de reservorio que contenía 18 % p/v de PEG 4000, 0,1 M de citrato de sodio, 0,2 M de acetato de amonio, pH 6.0. Se prepararon gotas compuestas de 1 µL de proteína + 1 µL de precipitado a 20 °C y los cristales aparecieron en un plazo de 3 a 7 días. Los cristales resultantes se crioprotegieron sumergiéndolos en una solución de pozo suplementada con etilenglicol al 35 %, después se enfriaron rápidamente y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta la recolección de datos. Los datos de difracción se recopilaron en el Swiss Light Source (SLS). Los datos se indexaron en P6522 y se integraron y escalaron usando XDS y XSCALE (W. Kabsch, Xds. Acta Crystallogr. D 66, 125-132 (2010)) con una resolución de 3,4 Å. La estructura se determinó mediante reemplazo molecular con Phaser. El Fab y CD38 de la estructura con código pdb 7DHA se usaron como modelo de búsqueda inicial y se encontraron dos copias del complejo anti-CD38-B3 Fab/hsCD38 en la unidad asimétrica. El refinamiento del cuerpo rígido, el recocido simulado y el refinamiento restringido se llevaron a cabo en Refmac (GN Murshudov, AA Vagin, EJ Dodson, Refinamiento de

estructuras macromoleculares mediante el método de máxima verosimilitud. Acta Crystallogr. D 53, 240-255 (1997)). Entre rondas de refinamiento, el modelo fue construido y ajustado usando Coot (P. Emsley, B. Lohkamp, WG Scott, K. Cowtan, Características y desarrollo de Coot. Acta Crystallogr. D 66, 486-501 (2010)).

La estructura se analizó con el programa Protein Interfaces, Surfaces, and Assemblies (PISA). Todas las figuras se realizaron con PyMol (DeLano Scientific).

10

Resultados y conclusión

Para obtener la resolución a nivel atómico de la interacción epítopo/parátopo, la estructura cristalina del Fab de anti-CD38-B3 (sec. con núm. de ident.: 110 y 15 sec. con núm. de ident.: 1) en complejo con el ectodominio del antígeno hsCD38 (sec. con núm. de ident.: 729) se resolvió a una resolución de 3,4 Å.

En la Figura 52A se muestra una representación de la estructura del Fab de anti-CD38-B3 unido a CD38. El Fab anti-CD38-B3 entierra un total de 1,707 Å² en la interfaz con hsCD38 (853 Å² para B3 y 854 Å² para CD38). El reconocimiento de CD38 está dominado por la cadena pesada, donde la región determinante de complementariedad de la cadena pesada 2 (HCDR2) y la HCDR3 establecen amplios 20 enlaces de hidrógeno y contactos hidrofóbicos con CD38. La 25 cadena ligera, a través de residuos expuestos en la punta

de LCDR1 y LCDR3, también interactúa con el antígeno a través de interacciones de hidrógeno e hidrofóbicas. La cadena pesada B3 contribuye al 68 % del área de superficie enterrada de Fab, similar a otros anticuerpos contra
5 antígenos proteicos.

El Fab de anti-CD38-B3 reconoce 23 residuos de CD38 humano a través de enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas y contactos hidrofóbicos (Figura 52B y Figura 52C). El epítipo consta de los residuos Glu103, Gln107, Thr114,
10 Thr116, Arg194, Arg195, Glu198, Ala199, Asp202, Ser224, His228, Asn229, Gln231, Pro232, Glu233, Lys234, Val235, Gln236, Ile265, Ser267, Lys268, Arg269 y Asn270. Los residuos dentro de HCDR2 y HCDR3 de B3, incluidos Arg50, Thr53, Asn56, Asn58, Ser95 y Ser100A, forman enlaces de
15 hidrógeno con los residuos en la superficie de CD38, incluidos His228, Gln231, Glu233, Lys268, Arg269. HCDR2 a través de Ile52, Gly54 y Ala55 establece contactos hidrofóbicos con los residuos Lys268 y Arg269. Tres residuos hidrófobos en HCDR3, Pro97, Leu99 y Gly100B
20 interactúan con residuos hidrófobos en CD38 así como con residuos polares circundantes, incluidos Pro232, Glu233, Lys234, Val235 y Gln236. Los residuos de HCDR1, a través de la cadena principal de Thr30 y Leu31, forman una interacción electrostática con Asn270. Curiosamente, Gln61
25 y Gln64, residuos dentro de la región marco de la cadena pesada anti-CD38-B3, también contribuyen a la interacción

con CD38 mediante interacciones con Gln107, Glu103 y Arg194.

La cadena ligera, a través de residuos expuestos en la punta de LCDR1 y LCDR3, también se conecta al antígeno a través de enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas (Figura 52C). Asn92 de LCDR3 es el único residuo de cadena ligera que se une a CD38 a través de un enlace de hidrógeno con Lys234. La cadena ligera también contribuye a las interacciones hidrofóbicas donde LCDR3 Trp94 interactúa con las porciones alifáticas de Gln231. El grupo de oxígeno carbonilo de la cadena principal de Glu1 dentro de la cadena ligera también contribuye a la interacción con la cadena lateral de Arg195.

La estructura cristalina del aglutinante B3 en complejo con CD38 confirmó los resultados del ensayo de competencia (Ejemplo 24): B3 reconoce un epítipo distinto pero superpuesto con daratumumab e isatuximab (2 residuos compartidos entre el epítipo de B3 y daratumumab, y 6 residuos compartidos entre el epítipo de B3 e isatuximab) (Figura 53A). Si bien los modos de unión de B3 y daratumumab muestran que ambos Fab pueden unirse simultáneamente a la superficie de CD38, las orientaciones de unión de B3 e isatuximab claramente causan una colisión estérica entre ambos Fab, lo que

impide su unión simultánea a CD38 (Figura 53B y Figura 53C).