

MOLECULAS MULTISPECÍFICAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE UNEN A CD38 Y 4-1BB, Y USOS DE LAS MISMAS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a moléculas multiespecíficas de unión a antígeno, que son específicas para CD38 y 4-1BB, y métodos de uso de las mismas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 Una copia oficial del listado de secuencias se presenta simultáneamente con la descripción electrónicamente a través del Centro de Patentes. El contenido del listado de secuencias electrónico (10927WO01_Sequence_Listing_ST26.xml; tamaño: 151 552 bytes; y fecha de creación: 17 de mayo de 2023) se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

- 15 El mieloma múltiple (MM) es el segundo tipo de cáncer de la sangre más frecuente después del linfoma no Hodgkin, con una prevalencia de ~120 000, y aproximadamente 30 000 casos nuevos y 13 000 muertes cada año en los Estados Unidos. El MM se caracteriza por una expansión clonal de células plasmáticas malignas que secretan citocinas de manera no regulada. La producción de citocinas, especialmente la IL-6, provoca daño localizado en órganos y tejidos, responsable de
20 muchos de los síntomas asociados con el mieloma. Los sujetos con MM sufren de dolor óseo y osteoporosis, anemia, trastorno de la función renal e insuficiencia renal, infecciones bacterianas y deterioros neurológicos. El MM rara vez es curable con una mediana de expectativa de vida de 4-5 años. Si bien se ha avanzado en el tratamiento del MM, las nuevas terapias han beneficiado de manera desproporcionada a los pacientes más jóvenes. El pronóstico de los pacientes con MM
25 recidivante es malo, y se necesitan urgentemente nuevos enfoques terapéuticos.

- CD38, también conocida como ADP ribosa cíclico hidrolasa, es una glicoproteína de superficie de 45 KDa expresada en timocitos, algunos linfocitos T y linfocitos B de sangre periférica activados, células plasmáticas, y células dendríticas. CD38 funciona como una ectoenzima involucrada en el metabolismo del dinucleótido de nicotinamida adenina extracelular (NAD⁺) y del fosfato de
30 dinucleótido de nicotinamida adenina citoplasmática (NADP) (Howard, y otros, Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* (1993) 262:1056–9), lo que da como resultado la producción de compuestos que movilizan el Ca²⁺, tales como

adenosín difosfato (ADP) ribosa cíclico, ADP ribosa (ADPR) y dinucleótido ácido nicotínico adenina fosfato. La regulación del calcio da como resultado la activación de vías de señalización que controlan una amplia gama de funciones fisiológicas, lo que incluye la proliferación de linfocitos, la liberación de insulina por parte del páncreas, la contracción del músculo cardíaco, la quimiotaxis de neutrófilos y la activación de linfocitos T. Las actividades enzimáticas de CD38 regulan los niveles de NAD⁺ y mejoran la función de los inhibidores del proteasoma (Cagnetta, y otros, Intracellular NAD(+) depletion enhances bortezomib-induced anti-myeloma activity. *Blood* (2013) 122:1243–55). Además, la ADPR puede metabolizarse por CD203a/PC-1 y CD73 para producir la molécula inmunosupresora de adenosina (ADO), lo que facilita el escape de células tumorales del control del sistema inmunitario (Chillemi y otros, Roles and modalities of ectonucleotidases in remodeling the multiple myeloma niche. *Front Immunol.* (2017) 8:305). CD38 parece contribuir al potencial proliferativo de la leucemia crónica de linfocitos B/linfoma linfocítico pequeño; las células plasmáticas malignas en la médula ósea expresan niveles altos y uniformes de CD38. Se cree que los anticuerpos monoclonales anti-CD38 agotan las células inmunosupresoras CD38⁺, tales como las células supresoras derivadas de mieloides, los linfocitos T reguladores y los linfocitos B reguladores, lo que conduce a un aumento de la actividad antitumoral de las células efectoras inmunitarias. El daratumumab, una molécula de unión a antígeno anti-CD38, se ha aprobado para pacientes con mieloma múltiple que son refractarios a la terapia convencional.

La activación de los linfocitos T implica la coestimulación a través de la superfamilia del receptor de TNF y es clave para la supervivencia, la adquisición de funciones efectoras y la diferenciación de la memoria. 4-1BB (Tnfrsf9), también conocido como CD137, es una glicoproteína de superficie y miembro de la superfamilia de receptores del TNF. La expresión del receptor se induce por la activación de linfocitos seguida del cebado mediado por TCR, pero sus niveles se pueden aumentar mediante la estimulación conjunta de CD28. Exposición a anticuerpos monoclonales de ligando o agonista en CD8⁺ Los linfocitos T coestimulan 4-1BB, que contribuyen a la expansión clonal, la supervivencia y el desarrollo de los linfocitos T, la proliferación inducida en los monocitos periféricos, la activación de NF-kappaB, la apoptosis de los linfocitos T mejorada inducida por la activación desencadenada por TCR/CD3, la generación de memoria y la regulación de la coestimulación de CD28 para promover las respuestas de los linfocitos Th1. El urelumab (BMS-663513), un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano, fue el primer fármaco terapéutico anti-4-1BB en entrar en ensayos clínicos. El desarrollo clínico se detuvo cuando se reveló la toxicidad hepática asociada con el anticuerpo. El utomilumab (PF-05082566) es un anticuerpo

monoclonal IgG2 humanizado que activa 4-1BB mientras bloquea la unión a 4-1BBL endógeno. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de enfoques alternativos para tratar el cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere, en parte, a moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se unen a CD38 y 4-1BB y su uso en el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno pueden usarse solas o en combinación con otros agentes para tratar los cánceres que expresan CD38.

10 Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción comprenden dos brazos de unión a antígeno, A1 y A2. El brazo A1 se une específicamente a CD38. El brazo A2 comprende un primer dominio de unión a antígeno (R1) y un segundo dominio de unión a antígeno (R2) y A2 se une específicamente a 4-1BB. R1 se enlaza a R2 a través de un enlazador, formando dominios de unión a antígeno apilados en el brazo A2. La combinación del brazo A1 y el brazo A2 apilado se denomina formato 1+2. Los dominios de unión a antígeno de A2 pueden
15 contenerse en los Fab. Ver la Figura 1. En algunos aspectos, R1 y R2 se unen a diferentes epítomos de 4-1BB. En algunos aspectos, R1 y R2 se unen a los mismos epítomos de 4-1BB. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos de R1 y R2 de las regiones variables de la cadena pesada son idénticas o sustancialmente similares, es decir, menos de 5, o menos de 4, o menos de 3, diferencias de aminoácidos en una región variable de la cadena pesada o una región determinante de la
20 complementariedad de la cadena pesada, o 2 o 1 diferencias de aminoácidos en una región variable de la cadena pesada o una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada. En algunos aspectos, las regiones variables de la cadena pesada R1 y R2 son diferentes, es decir, tienen diferentes secuencias de unión a antígeno. En algunas modalidades, R1 está comprendido en una primera Fab (Fab2) y R2 está comprendido en una segunda Fab (Fab3). Los Fab2 y Fab3 de la
25 construcción anti-CD38xanti-4-1BB 1+2 se conectan a través de un enlazador desde el N-terminal del VH-2 4-1BB "IN" Fab2 al C-terminal del CH1-3 "OUT" Fab3.

Moléculas de unión a antígeno multiespecíficas que comprenden dominios de unión a antígeno anti-CD38 y anti-4-1BB

30 La presente descripción proporciona moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se unen a CD38 y 4-1BB. Dichas moléculas multiespecíficas de unión a antígeno también se denominan en la presente descripción "moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38/anti-4-1BB". El brazo de unión a antígeno CD38 A1 comprende un dominio de unión a antígeno. El brazo de unión

a antígeno 4-1BB A2 comprende dos dominios de unión a antígeno, R1 y R2. El R1 se denomina en la presente descripción como el dominio de unión “IN” 4-1BB y el R2 se denomina en la presente descripción como el dominio “OUT” 4-1BB. Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que tienen los dominios de unión a antígeno apilados se denominan en la presente descripción como moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38/anti-4-1BB 1+2, o moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38xanti-4-1BB 1+2, etc.

La porción anti-CD38 de la molécula multiespecífica anti-CD38/anti-4-1BB es útil para dirigirse a células tumorales que expresan CD38 (por ejemplo, células plasmáticas) y la porción anti-4-1BB de la molécula multiespecífica es útil para proporcionar coestimulación de linfocitos T activadas por péptido MHC cognado o moléculas de unión a antígeno multiespecífico CD3 dirigidas al tumor. La unión simultánea de CD38 en una célula tumoral y 4-1BB en un linfocito T facilita la destrucción dirigida (lisis celular) de la célula tumoral diana por el linfocito T activado. Por lo tanto, las moléculas multiespecíficas anti-CD38/anti-4-1BB 1+2 proporcionadas en la presente descripción son útiles, entre otros, para tratar enfermedades y trastornos relacionados o causados por tumores que expresan CD38 (por ejemplo, linfomas, leucemias, mieloma múltiple, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma, adenocarcinoma ductal pancreático, glioma o cáncer de mama).

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción comprenden un primer brazo de unión a antígeno A1 que comprende un dominio de unión a antígeno, que se une específicamente a CD38 humano, y un segundo brazo de unión a antígeno A2 que comprende dos dominios de unión a antígeno, R1 y R2, que se unen específicamente a 4-1BB. La presente descripción incluye moléculas multiespecíficas anti-CD38/anti-4-1BB 1+2 (por ejemplo, moléculas multiespecíficas de unión a antígeno) en donde cada dominio de unión a antígeno, comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) emparejada con una región variable de la cadena ligera (LCVR). En ciertas modalidades ilustrativas de la invención, el dominio de unión a antígeno anti-CD38 y los dominios de unión a antígeno anti-4-1BB comprenden cada uno HCVR diferentes distintos emparejados con una LCVR común o LCVR universal. Por ejemplo, como se ilustra en el Ejemplo 4 en la presente descripción, se construyeron moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD38, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR derivado de una molécula de unión a antígeno anti-CD38; y un segundo dominio de unión a antígeno (R1) y un tercer dominio de unión a antígeno (R2) que se unen específicamente a 4-1BB, en donde el segundo

dominio de unión a antígeno (R1) y el tercer dominio de unión a antígeno (R2) comprenden cada uno una HCVR derivado de una molécula de unión a antígeno anti-4-1BB, donde cada HCVR se empareja con una cadena ligera universal LCVR. En tales modalidades, el primer, segundo y tercer dominio de unión a antígeno comprenden distintos HCVR anti-CD38 y anti-4-1BB, respectivamente, pero comparten una LCVR de cadena ligera común.

En la presente descripción se proporcionan moléculas biespecíficas de unión a antígenos que comprenden:

(a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende tres CDR de una región variable de la cadena pesada (HCVR) y tres CDR de una LCVR, en donde el primer brazo de unión a antígeno se une específicamente a CD38; y

(b) un segundo brazo de unión a antígeno que comprende una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende tres CDR de una HCVR (R1-HCVR) y tres CDR de una LCVR (R1-LCVR); y una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende tres CDR de una HCVR (R2-HCVR) y tres CDR de una LCVR (R2-LCVR), en donde el segundo brazo de unión a antígeno se une específicamente a 4-1BB.

En algunos aspectos, R1 y R2 se unen al mismo epítipo en 4-1BB. En algunos aspectos, R1 y R2 se unen a epítopos diferentes en 4-1BB.

En algunos aspectos, R1 y R2 se conectan a través de un enlazador peptídico. Un enlazador peptídico ilustrativo comprende una secuencia peptídica de (GGGGS)_n, en donde n es de 1 a 6.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el primer brazo de unión a antígeno comprende tres CDR de una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 40.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el primer brazo de unión a antígeno comprende tres CDR de una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el primer brazo de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1-HCDR2-HCDR3) que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4-6-8 y 42-44-46, respectivamente.

- En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el primer brazo de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR1-LCDR2-LCDR3) que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 20-22-24 y 50-52-54, respectivamente.
- En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el primer brazo de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 40.
- En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el primer brazo de unión a antígeno comprende una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.
- En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el primer brazo de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 40; y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.
- En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende un primer brazo de unión a antígeno, en donde el segundo brazo de unión a antígeno comprende un primer región de unión a antígeno (R1); y una segunda región de unión a antígeno (R2).
- En algunos aspectos, R1 comprende tres CDR de una HCVR (R1-HCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 32, 62, 72, 86 y 94.
- En algunos aspectos, R1 comprende tres CDR de una LCVR (R1-LCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.
- En algunos aspectos, R1 comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (R1-HCDR1-R1-HCDR2-R1-HCDR3) que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12-14-16, 34-36-38, 64-66-68, 74-76-78, 88-90-92, y 96-98-100, respectivamente.
- En algunos aspectos, R1 comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (R1-LCDR1-R1-LCDR2-R1-LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 20-22-24 y 50-52-54, respectivamente.

En algunos aspectos, R1 comprende una HCVR (R1-HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 32, 62, 72, 86 y 94.

5 En algunos aspectos, R1 comprende una LCVR (R1-LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.

En algunos aspectos, R1 comprende una R1-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 32, 62, 72, 86 y 94; y una R1-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.

10 En algunos aspectos, R2 comprende tres CDR de una HCVR (R2-HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 32, 62, 72, 86 y 94.

En algunos aspectos, R2 comprende tres CDR de una LCVR (R2-LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.

15 En algunos aspectos, R2 comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (R2-HCDR1-R2-HCDR2-R2-HCDR3) que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12-14-16, 34-36-38, 64-66-68, 74-76-78, 88-90-92, y 96-98-100, respectivamente.

20 En algunos aspectos, R2 comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (R2-LCDR1-R2-LCDR2-R2-LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 20-22-24 y 50-52-54, respectivamente.

En algunos aspectos, R2 comprende una HCVR (R2-HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 32, 62, 72, 86 y 94.

25 En algunos aspectos, R2 comprende una LCVR (R2-LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.

En algunos aspectos, R2 comprende una R2-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 32, 62, 72, 86 y 94; y una R2-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 48.

30 En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende:

(a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende tres CDR de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y tres CDR de una LCVR que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; y

(b) un segundo brazo de unión a antígeno que comprende:

(i) una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende tres CDR de R1-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 62 y 72; y tres CDR de R1-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y

(ii) una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende tres CDR de R2-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 62, 84 y 94; y tres CDR de R2-LCVR que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende:

(a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 que comprende secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 42-44-46-50-52-54, respectivamente; y

(b) un segundo brazo de unión a antígeno que comprende:

(i) una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende R1-HCDR1-R1-HCDR2-R1-HCDR3-R1-LCDR1-R1-LCDR2-R1-LCDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34-36-38-50-52-54, 64-66-68-50-52-54 y 74-76-78-50-52-54, respectivamente; y

(ii) una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende R2-HCDR1-R2-HCDR2-R2-HCDR3-R2-LCDR1-R2-LCDR2-R2-LCDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 64-66-68-50-52-54, 74-76-78-50-52-54 y 88-90-92-50-52-54, respectivamente.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende:

(a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; y

(b) un segundo brazo de unión a antígeno que comprende:

(i) una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende R1-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, 62 y 72; y R1-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y

(ii) una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende R2-HCVR que comprende la

secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 62, 86 y 94; y R2-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende:

- 5 (a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; y
- (b) un segundo brazo de unión a antígeno que comprende:
 - (i) una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende R1-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; y R1-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y
 - 10 (ii) una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende R2-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86; y R2-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende:

- 15 (a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48; y
- (b) un segundo brazo de unión a antígeno que comprende:
 - (i) una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende R1-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y R1-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y
 - 20 (ii) una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende R2-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94; y R2-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

25 En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende:

- (a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y
- (b) el segundo brazo de unión a antígeno que comprende:
 - 30 (i) una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende R1-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y R1-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y

(ii) una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende R2-HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y R2-LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico.

5 En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico que comprende una región constante de la cadena pesada del isotipo IgG1 o IgG4.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende la HCVR del primer brazo de unión a antígeno y una segunda cadena pesada que comprende R1-HCVR y R2-HCVR del segundo brazo de unión a antígeno, en donde la segunda
10 cadena pesada comprende las mutaciones H435R y Y436F (numeración de la UE).

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende la HCVR del primer brazo de unión a antígeno emparejado con una cadena ligera que comprende la LCVR del primer brazo de unión a antígeno, en donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 y la cadena ligera comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una segunda cadena pesada que comprende R1-HCVR y R2-HCVR del segundo brazo de unión a antígeno emparejado con una primera cadena ligera que comprende R1-LCVR y una segunda cadena ligera que comprende R2-LCVR, en donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada
20 del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 56, 70, 80, 82 y 84; la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 y la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende:

(a) un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano que comprende
25 una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 58, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60; y

(b) un segundo brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60, y una segunda cadena ligera que comprende
30 la secuencia de SEQ ID NO: 60.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende:

(a) un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano que comprende

una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 58, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60; y

- 5 (b) un segundo brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 70, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende:

- 10 (a) un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 58, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60; y

(b) un segundo brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 80, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60.

- 15 En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende:

(a) un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 58, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60; y

- 20 (b) un segundo brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende:

- 25 (a) un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 58, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60; y

- 30 (b) un segundo brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 84, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60, y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60.

En la presente descripción se proporciona una molécula biespecífica de unión a antígeno que comprende un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 y un segundo

brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB, en donde:

(a) el primer brazo de unión a antígeno comprende tres CDR de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, y tres CDR de LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y

5 (b) el segundo brazo de unión a antígeno comprende:

(i) una primera región de unión a antígeno (R1) que comprende tres CDR de una HCVR (R1-HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y tres CDR de una LCVR (R1-LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; y

10 (ii) una segunda región de unión a antígeno (R2) que comprende tres CDR de una HCVR (R2-HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y tres CDR de una LCVR (R2-LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico.

En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende la HCVR del primer brazo de unión a antígeno, en donde la primera cadena pesada se
15 empareja con una cadena ligera que comprende la LCVR del primer brazo de unión a antígeno, en donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60. En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una segunda cadena pesada que comprende R1-HCVR y R2-HCVR del segundo brazo de unión a antígeno, en donde la segunda cadena pesada se empareja con
20 una primera cadena ligera que comprende R1-LCVR, y una segunda cadena ligera que comprende R2-LCVR, en donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70, 82 u 84, la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, y la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60.

En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión a antígeno comprende:

25 (a) un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 58, y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60; y

(b) un segundo brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB humano que comprende:

30 (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 70, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60;

(ii) una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60; o

(iii) una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 84, una primera cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60.

En algunas modalidades, la molécula multiespecífica de unión a antígeno inhibe la proliferación de linfocitos tumorales CD38⁺ seleccionadas del grupo que consiste en células de mieloma, células de leucemia, células de linfoma, células de carcinoma hepatocelular, células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, células de melanoma, células de adenocarcinoma ductal pancreático, células de glioma o células de cáncer de mama.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la molécula multiespecífica de unión a antígeno y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención presenta una composición que es una combinación de una molécula de unión a antígenos multiespecífica anti-CD38/anti-4-1BB 1 + 2 y un segundo agente terapéutico. En una modalidad, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combina ventajosamente con una molécula de unión a antígenos multiespecífica anti-CD38/anti-4-1BB 1 + 2.

En otro aspecto, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los A1 o A2. En algunos aspectos, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, cadena pesada y/o cadena ligera. En algunas modalidades, se proporcionan la molécula de ácido nucleico que comprende una o más secuencias de nucleótidos establecidas en las Tablas 2, 4, 6, 8 o 10. Las moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de ácido nucleico pueden estar en cualquier combinación o disposición funcional de las mismas.

En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada (HCVR) de un brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A1, en donde A1 se une a CD38, y en donde (a) la HCVR comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1-HCDR2-HCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 42, 44 y 46, respectivamente o (b) la HCVR

comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40.

En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A1, en donde A1 se une a CD38, y en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

En algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las regiones variables de la cadena pesada (HCVR) de una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la cadena de unión a antígeno A2, en donde A2 comprende un primer dominio de unión a antígeno (R1) que se une a 4-1BB y un segundo dominio de unión a antígeno (R2) que se une a 4-1BB, y en donde (a) R1-HCVR comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 34, 36 y 38, y R2-HCVR comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 88, 90 y 92, o (b) R1-HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 y R2-HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86.

En la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A2, en donde A2 se une a 4-1BB, y en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56.

Además, en la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una primera región variable de la cadena pesada (HCVR) y una segunda HCVR de una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la cadena de unión a antígeno A2, en donde A2 se une a 4-1BB, y en donde (a) la primera HCVR comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 64, 66 y 68, y la segunda HCVR comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 64, 66 y 68, o (b) la primera HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y la segunda HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.

Además, en la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un brazo de unión a

antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A2, en donde A2 se une a 4-1BB, y en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 70, 82 y 84.

5 En la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una primera región variable de la cadena pesada (HCVR) y una segunda HCVR de una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la cadena pesada A2, en donde A2 se une a 4-1BB, y en donde (a) la primera HCVR comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 74, 76 y 78, y la segunda HCVR
10 comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 96, 98 y 100, o (b) la primera HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y la segunda HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

En la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende
15 una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A2, en donde A2 se une a 4-1BB, y en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80.

Además, en la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera (LCVR) de una molécula multiespecífica de unión a antígeno, en donde (a) la LCVR comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 50, 52 y 54, o (b) la LCVR
20 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48.

Y en la presente descripción se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende
25 una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de una molécula multiespecífica de unión a antígeno, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En la presente descripción se proporciona un vector de expresión o un conjunto de vectores de expresión que comprende una o más moléculas de ácido nucleico de cualquiera de los ácidos
30 nucleicos descritos anteriormente. También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de expresión proporcionados en la presente descripción. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula de mamífero o una célula procariota. En algunos aspectos, la célula

huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una *Escherichia coli* (*E. coli*) célula. Se proporcionan además composiciones que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para producir una molécula multiespecífica de unión a antígeno. Como se proporciona en la presente descripción, el método comprende cultivar una célula huésped en condiciones que permiten la producción de la molécula multiespecífica de unión a antígeno, en donde la célula huésped comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada (HCVR) de un brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A1, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica regiones variables de cadena pesada (HCVR) de un brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A2, y/o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera común (LCVR). En algunos aspectos, cada molécula de ácido nucleico está en el mismo vector de expresión. En algunos aspectos, una o más de las moléculas de ácido nucleico están en diferentes vectores de expresión. En algunos aspectos, la célula huésped comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada del brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A1, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada del brazo de unión a antígeno de la molécula multiespecífica de unión a antígeno A2, y/o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común. En algunos aspectos, cada molécula de ácido nucleico está en el mismo vector de expresión. En algunos aspectos, una o más de las moléculas de ácido nucleico están en diferentes vectores de expresión.

En la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto, que comprende administrar a cualquier uno o más de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se describen en la presente descripción, o las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en la presente descripción, al sujeto. En algunos aspectos, el tumor de células plasmáticas es un mieloma múltiple.

También se proporciona en la presente descripción el uso de una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se describe en la presente descripción, o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto. La molécula multiespecífica de unión

a antígeno o la composición farmacéutica pueden administrarse al sujeto. En algunos aspectos, el tumor de células plasmáticas es un mieloma múltiple.

En la presente descripción se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, comprendiendo el método administrar una o más de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno descritas en la presente descripción, o las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción, al sujeto. En algunos aspectos, el tumor se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, linfoma, leucemia de linfocitos B, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma, adenocarcinoma ductal pancreático, glioma o cáncer de mama, u otro cáncer caracterizado en parte por tener células CD38+.

También se proporciona en la presente descripción el uso de una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se describe en la presente descripción, o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto. La molécula multiespecífica de unión a antígeno o la composición farmacéutica pueden administrarse al sujeto. En algunos aspectos, el tumor se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, linfoma, leucemia de linfocitos B, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma, adenocarcinoma ductal pancreático, glioma o cáncer de mama, u otro cáncer caracterizado en parte por tener células CD38+.

En la presente descripción se proporciona un método para tratar a un paciente que padece de mieloma múltiple, o de otra malignidad de linfocitos B que expresan BCMA que comprende administrar una molécula multiespecífica de unión a antígeno proporcionada en la presente descripción, o una composición farmacéutica proporcionada en la presente descripción, al sujeto. En algunos aspectos, la malignidad de linfocitos B que expresan BCMA se selecciona del grupo que consiste en macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B, linfoma de Non-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, linfoma linfoplasmocítico y linfoma de Hodgkin.

También se proporciona en la presente descripción el uso de una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se describe en la presente descripción, o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece de mieloma múltiple, o de otra malignidad de linfocitos B que expresan BCMA. La molécula multiespecífica de unión a antígeno o la composición farmacéutica pueden administrarse al sujeto.

En la presente descripción se proporciona un método para tratar a un paciente que padece de un

tumor CD38+ y/o un tumor que expresa BCMA. El método comprende administrar una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se describe en la presente descripción, o una composición farmacéutica que se describe en la presente descripción, al sujeto en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno de este. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, cemiplimab (bsAb2810). También se proporciona en la presente descripción el uso de una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se describe en la presente descripción, o una composición farmacéutica que se proporciona en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece de un tumor CD38+ y/o un tumor que expresa BCMA.

En algunas modalidades, los métodos o usos proporcionados en la presente descripción comprenden además administrar un segundo agente terapéutico o régimen terapéutico. En algunos aspectos, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo que se une a los tumores de células plasmáticas. En algunos aspectos, el segundo agente terapéutico es una molécula biespecífica de unión a antígeno anti-BCMA/anti-CD3. En algunos aspectos, el segundo agente terapéutico es una molécula biespecífica de unión a antígeno anti-CD20/anti-CD3. En algunos aspectos, el segundo agente terapéutico es una molécula biespecífica de unión a antígeno anti-CD28/anti-4-1BB. En algunos aspectos, el segundo agente terapéutico o régimen terapéutico comprende un fármaco quimioterápico, alquilantes de ADN, inmunomoduladores, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la histona deacetilasa, radioterapia, un trasplante de células madre, un virus oncolítico, una vacuna contra el cáncer, una inmunocitocina, un CAR-T, un anticuerpo biespecífico diferente que interactúa con un antígeno diferente de la superficie de la célula tumoral y un antígeno de célula T o de célula inmunitaria, un conjugado de fármaco de anticuerpo, un conjugado de anticuerpo biespecífico que se conjuga con un agente antitumoral, un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor del punto de control CTLA-4, un inhibidor de CD22, un inhibidor de BCMA, un agonista de CD28, un inhibidor de CD20, o sus combinaciones.

Se proporcionan además usos de una molécula multiespecífica de unión a antígeno proporcionada en la presente descripción, o una composición farmacéutica proporcionada en la presente descripción, en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD38, CD20 y/o BCMA. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es cáncer. En algunos aspectos, el cáncer es un mieloma múltiple. En algunos aspectos, la molécula multiespecífica de unión a antígeno o la composición farmacéutica es para su uso en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. La molécula multiespecífica de unión a antígeno, o la

composición farmacéutica que comprende la molécula multiespecífica de unión a antígeno, se inyecta por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

En la presente descripción se proporcionan moléculas multiespecíficas de unión a antígeno 1+2 anti-CD38/anti-4-1BB que tienen un patrón de glucosilación modificado. En algunas aplicaciones, la modificación para eliminar sitios de glucosilación no deseados puede ser útil, o una molécula de unión a antígeno que carece de una porción de fucosa presente en la cadena de oligosacáridos, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de la molécula de unión a antígeno (ADCC) (ver Shield y otros (2002) JBC 277:26733). En otras aplicaciones, la modificación de la galactosilación puede producirse para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

En otro aspecto más, en la presente descripción se proporcionan los métodos terapéuticos para dirigirse/ destruir células tumorales que expresan CD38 mediante el uso de una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD38/anti-4-1BB de la invención, en donde los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD38/anti-4-1BB proporcionada en la presente descripción a un sujeto que lo necesita.

La presente descripción también incluye el uso de una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD38/anti-4-1BB que se proporciona en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado o causado por la expresión de CD38.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un esquema que representa la estructura de una molécula multiespecífica de unión a antígeno 1+2 anti-CD38 x anti-4-1BB ilustrativa. El brazo de unión a antígeno A1 comprende Fab1, que es específico para CD38, mientras que el brazo de unión a antígeno A2 comprende dos Fab, Fab2 y Fab3, cada uno de los cuales es específico para 4-1BB. Los Fab2 y Fab3 de la construcción anti-CD38xanti-4-1BB 1+2 se conectan a través de un enlazador desde el N-terminal del VH-2 4-1BB “IN” Fab2 al C-terminal del CH1-3 “OUT” Fab3. Las cadenas ligeras Fab1, Fab2 y Fab3 comprenden las cadenas ligeras universales VL-1, VL-2 y VL-3, respectivamente.

La Figura 2A compara el porcentaje de activación de 4-1BB en el ensayo indicador de Jurkat mediante moléculas multiespecíficas de unión a antígeno en varios formatos, que incluyen los Fabs

4-1BB divididos idénticos, los Fabs 4-1BB apilados idénticos y los Fabs 4-1BB apilados mezclados. La Figura 2B ilustra las diversas construcciones probadas en la pantalla y representa el bioensayo dependiente de la diana.

La Figura 3 ilustra la carga tumoral *in vivo* a lo largo del tiempo después de la administración de células tumorales de mieloma múltiple humano a NOD.Cg-Prkdc inmunodeficiente^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) ratones inyectados por vía intraperitoneal con 4x10⁶ células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

La Figura 4A ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con PBS con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; Figura 4B ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con el bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + el bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; La Figura 4C ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con el bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; Figura 4D ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + 4-1BB-binding control bsAb (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; Figura 4E ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solo para el propósito de describir modalidades particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención solo se limitará por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico que se menciona en particular, significa que el valor puede variar del valor que se menciona en no más de 1 %. Por ejemplo, como se usa en la presente descripción, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores entre ellos (por ejemplo, 99.1, 99.2,

99.3, 99.4, etcétera).

Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones que no sean patentes, mencionadas en esta descripción, se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Definiciones

La expresión "4-1BB", como se usa en la presente descripción, se refiere a un receptor para 4-1BBL. La reticulación de 4-1BB por 4-1BBL mejora la activación de los linfocitos T. El 4-1BB humano (o CD137) que tiene el número de acceso de UniProt Q07011 comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 101; los residuos de aminoácidos 1-23 son el péptido señal. Los residuos 24-186 constituyen el dominio extracelular del receptor.

4-1BB humano (*Inmunógeno*) secuencia de aminoácidos

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRT
CDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDC
CFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREP
GHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
FPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 101)

Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas en la presente descripción pretenden referirse a la versión humana de la proteína, polipéptido o fragmento de proteína respectivo, a menos que se especifique explícitamente que es de una especie no humana. Por tanto, la expresión "4-1BB" significa 4-1BB humano a menos que se especifique que es de una especie no humana, por ejemplo, "ratón 4-1BB", "mono 4-1BB", etc.

Como se usa en la presente descripción, "una molécula de unión a antígeno que se une a 4-1BB" o una "molécula de unión a antígeno anti-4-1BB" incluye moléculas de unión a antígeno que reconocen específicamente a 4-1BB expresado en la superficie de una célula. Las moléculas de unión a antígeno 4-1BB anti proporcionadas en la presente descripción comprenden VR y CDR como se describe en la presente descripción. En ciertas modalidades, las moléculas de unión a antígeno son anticuerpos. En ciertas modalidades, las moléculas de unión a antígeno son anticuerpos biespecíficos.

La expresión "CD38", como se usa en la presente descripción, también conocida como ciclo ADP ribosa hidrolasa, se refiere a una glicoproteína que se expresa en células plasmáticas malignas. CD38

desempeña un papel central en la regulación de los niveles de calcio intracelular. La proteína tiene una cola citoplasmática N-terminal, un único dominio de membrana y una región extracelular C-terminal con cuatro sitios de N-glicosilación. El término "CD38" como se usa en la presente descripción, se refiere a la proteína CD38 humana a menos que se especifique que es de una especie no humana (por ejemplo, "CD38 de ratón", "CD38 de mono", etc.). La proteína CD38 humana tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 102 (Dominio extracelular de CD38 humano (V43-I300).mFc), y/o que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en el NCBI número de acceso NP_001766.2 o NM_001775.3.

Dominio extracelular de CD38 humano (V43-I300).mFc (*Inmunógeno*) aminoácido

VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNIT
EEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDLTWCG
EFNTSKINYQSCPDWRKDCSNPVSFVKTVSRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNST
FGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFSCCKNIYRPDK
FLQCVKNPEDSSCTSEIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCV
VVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKC
KVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW
TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKS
FSRTPGK* (SEQ ID NO: 102) Secuencia de mFc subrayada

Como se usa en la presente descripción, "una molécula de unión a antígeno que se une a CD38" o una "molécula de unión a antígeno anti-CD38" incluye moléculas de unión a antígeno que reconocen específicamente a CD38.

El término "molécula de unión a antígeno" incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno, por ejemplo, moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2. Las moléculas de unión a antígeno anti-CD38 que se proporcionan en la presente descripción comprenden VR y CDR como se describe en la presente descripción. En ciertas modalidades, las moléculas de unión a antígeno son anticuerpos. En ciertas modalidades, las moléculas de unión a antígeno son anticuerpos biespecíficos.

El término "molécula de unión a antígeno", como se usa en la presente descripción, significa cualquier molécula de unión a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a o interactúa con un antígeno particular (por ejemplo, CD38 o 4-1BB). El término "molécula de unión a antígeno" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas

(H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como también multiméricos de las mismas (por ejemplo, IgM). El término "molécula de unión a antígeno" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden dos brazos de unión a antígeno, A1 y A2. El término "molécula de unión a antígeno" también incluye moléculas de inmunoglobulina que consisten de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada brazo de unión a antígeno comprende una cadena pesada, que a su vez comprende al menos una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en la presente descripción como HCVR o VH-1, VH-2 o VH-3) y una región constante de la cadena pesada (CH1-1, CH1-2 y CH1-3). La región constante de la cadena pesada comprende además CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (que se abrevia en la presente descripción como LCVR; en el brazo A1, VL-1; en el brazo A2, VL-2 y VL-3) y una región constante de la cadena ligera (en el brazo A1, CL-1, y en el brazo A2, CL-2 y CL-3). Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que se conservan más, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes modalidades de la invención, las FR del brazo de unión a antígeno anti-CD38 o el brazo de unión a antígeno anti-4-1BB (o la porción de unión a antígeno de los mismos) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden ser modificadas de forma natural o artificial. Una secuencia consenso de aminoácidos se puede definir en base a un análisis lado a lado de dos o más CDR.

Los términos "porción de unión a antígeno" de una molécula de unión a antígeno, "fragmento de unión a antígeno de la misma" de una molécula de unión a antígeno y similares, como se usa en la presente descripción, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, que se obtiene por enzimas, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Un fragmento de unión a antígeno de una molécula de unión a antígeno puede derivarse, por ejemplo, a partir de moléculas de unión a antígeno completo mediante el uso de cualquier técnica estándar adecuada, como la digestión proteolítica o las técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y, opcionalmente, constantes de la molécula de unión a antígeno. Tal ADN se conoce y/o está fácilmente disponible desde, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, por ejemplo, bibliotecas de moléculas de unión a antígeno-fago), o pueden sintetizarse. El

ADN se puede secuenciar y manipular químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etcétera.

- 5 Una molécula de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2 de unión a antígeno típicamente comprenderá al menos tres dominios variables. Un dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que es adyacente a o en el marco con una o más secuencias de la estructura. Al tener un dominio VH asociado con un dominio VL, los dominios VH y VL pueden situarse entre sí en cualquier disposición adecuada. Por
10 ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros VH-VH, VH-VL o VL-VL. Alternativamente, la molécula de unión a antígeno puede contener un dominio monomérico VH o VL.

- En ciertas modalidades, una molécula de unión a antígeno puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ilustrativas no
15 limitativas de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente invención incluyen: (i) $V_{H1}-C_{H1}-1$; (ii) $V_{H2}-C_{H1}-2$; (iii) $V_{H3}-C_{H1}-3$; (iv) $V_{H1}-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_{H1}-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_{H2}-C_{H1}-2-C_{H2}$; (vii) $V_{H2}-C_{H1}-2-C_{H2}-C_{H3}$; (viii) $V_{H3}-C_{H1}-3$; (ix) $V_{H3}-C_{H1}-3-V_{H2}-C_{H1}-2$; (x) $V_{H3}-C_{H1}-3-V_{H2}-C_{H1}-2-C_{H2}$; (xi) $V_{H3}-C_{H1}-3-V_{H2}-C_{H1}-2-C_{H2}-C_{H3}$; (xii) V_H-CL ; (xiii) $V_L-1-CL1$; (xiv) $V_L-2-CL2$; (xv) $V_L-3-CL3$;
20 (xvi) $V_L-3-CL3-C_{H1}-3$; (xvii) $V_L-2-CL-2-C_{H1}-2$; (xviii) $V_{L1}-CL1-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xix) $V_L-2-CL2-C_{H1}-2$; (xx) $V_L-2-CL2-C_{H1}-2-C_{H2}$; (xxi) $V_L-2-CL2-C_{H1}-2-C_{H2}-C_{H3}$; (xxii) $V_L-3-CL3-C_{H1}-3-V_{H2}-C_{H1}-2-C_{H2}$; (xxiii) $V_L-3-CL3-C_{H1}-3-V_{H2}-C_{H1}-2-C_{H2}-C_{H3}$; y (xxiv) V_L-CL . En cualquier configuración de los dominios variables y constantes, que incluye cualquiera de las configuraciones ilustrativas enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes se pueden enlazar ya sea
25 directamente entre sí o se pueden enlazar por una región bisagra o enlazadora total o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre los dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica.

- De manera ilustrativa, la Figura 1 muestra un brazo de unión a antígeno A1 que comprende Fab1,
30 que es específico para CD38, y un brazo de unión a antígeno A2 que comprende dos Fab, Fab2 y Fab3, cada uno de los cuales es específico para 4-1BB. Las cadenas ligeras Fab1, Fab2 y Fab3 pueden ser cadenas ligeras universales. En este ejemplo, la V_L-1 se enlaza a la $CL-1$, que se une a la

C_H1-1 en el brazo A1. En el brazo A2, la V_L-3 se enlaza a la C_L-3, que se enlaza a la C_H1-3. Igualmente, la V_L-2 se enlaza con la C_L-2, que se enlaza a la C_H1-2. Los Fab2 y Fab3 de la construcción anti-CD38xanti-4-1BB 1+2 se conectan a través de un enlazador desde el N-terminal del V_H-2 4-1BB "IN" Fab2 al C-terminal del C_H1-3 "OUT" Fab3.

5 Las moléculas de unión a antígeno de la presente invención pueden funcionar a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad mediada por células dependiente de la molécula de unión a antígeno (ADCC). La "citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de células que expresan antígenos por una molécula de unión a antígenos de la invención en presencia del complemento. La "citotoxicidad celular mediada por anticuerpos dependiente de la unión a antígenos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por
10 células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc (FcR) (por ejemplo, las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos) reconocen la molécula de unión a antígeno unida en una célula diana y de esta manera conducen a la lisis de la célula diana. La CDC y la ADCC pueden medirse mediante el uso de ensayos que se conocen bien y se encuentran
15 disponibles en la técnica. (Ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos Núms 5.500.362 y 5.821.337, y Clynes y otros (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 95:652-656). La región constante de una molécula de unión a antígeno es importante en la capacidad de una molécula de unión a antígeno para fijar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por tanto, el isotipo de una molécula de unión a antígeno puede seleccionarse en base a si es conveniente
20 que la molécula de unión a antígeno medie la citotoxicidad.

En ciertas modalidades de la invención, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2 proporcionadas en la presente descripción son moléculas de unión a antígenos humanos. El término "molécula de unión a antígeno humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir moléculas de unión a antígeno que tienen regiones variables y
25 constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Las moléculas de unión a antígenos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en los CDR y en particular en CDR3. Sin embargo, el término "molécula de unión a
30 antígeno humano", como se usa en la presente descripción, no pretende incluir moléculas de unión a antígeno en las que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de la estructura humana.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción pueden, en algunas modalidades, ser moléculas de unión a antígeno humano recombinantes. El término "molécula de unión a antígeno humana recombinante", como se usa en la presente descripción, pretende incluir todas las moléculas de unión a antígeno humano que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como las moléculas de unión a antígeno que se expresan mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito más abajo), las moléculas de unión a antígeno que se aíslan de una biblioteca de moléculas de unión a antígeno humana recombinante y combinatoria (descrito más abajo), las moléculas de unión a antígeno que se aíslan de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (ver por ejemplo, Taylor y otros (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o las moléculas de unión a antígeno que se preparan, expresan, crean o aíslan por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichas moléculas de unión a antígeno humano recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales moléculas de unión a antígeno humano recombinantes se someten a *in vitro* mutagénesis (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, *in vivo* mutagénesis somática) y por tanto las secuencias de aminoácidos de la V_H y V_L. Las regiones de las moléculas de unión a antígeno recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y se relacionan con la línea germinal humana V_H y V_L secuencias, puede que no existan de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de la molécula de unión a antígeno humano *in vivo*.

Las moléculas de unión a antígenos humanos pueden existir en dos formas que se asocian con la heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende un constructo estable de cuatro cadenas de aproximadamente 150-160 kDa en el que los dímeros se mantienen unidos por un enlace disulfuro entre las cadenas pesadas. En una segunda forma, los dímeros no se enlazan a través de enlaces disulfuro entre cadenas y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y pesada que se acopla covalentemente (molécula de unión a medio antígeno). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en varios isotipos de IgG intactos se debe, pero no se limita a, las diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra de la molécula de unión a antígeno. Una sustitución de un único aminoácido en la región bisagra de la bisagra de

IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal y otros (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles que se observan típicamente mediante el uso de una bisagra de IgG1 humana. La presente invención abarca moléculas de unión a antígeno que tienen una o más mutaciones en la bisagra, C_H2 o C_H3 que puede ser conveniente, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de la molécula de unión a antígeno deseada.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la invención pueden ser moléculas de unión a antígeno aisladas. Una "molécula multiespecífica de unión a antígeno aislada", como se usa en la presente descripción, significa una molécula de unión a antígeno que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno que se ha separado o eliminado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en el que la molécula de unión a antígeno existe de forma natural o se produce de forma natural, es una "molécula de unión a antígeno aislada" para los propósitos de la presente invención. Una molécula de unión a antígeno aislada también incluye una molécula de unión a antígeno *in situ* dentro de una célula recombinante. Las moléculas de unión a antígeno aisladas son moléculas de unión a antígeno que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con ciertas modalidades, una molécula de unión a antígeno aislada puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Las moléculas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2 descritas en la presente descripción pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en el marco y/o CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal correspondientes de las que se derivaron las moléculas de unión a antígeno. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción con las secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de moléculas de unión a antígenos. La presente descripción incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción, en donde uno o más aminoácidos dentro de uno o más marcos y/o CDR se mutan con relación a las secuencias proporcionadas en la presente descripción. En algunos aspectos, la mutación se realiza para reflejar el(los) residuo(s) correspondiente(s) de la secuencia de línea germinal a partir de la cual se derivó la molécula de unión a antígeno, o al(los) residuo(s) correspondiente(s) de otra secuencia de línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del(los) residuo(s) de línea germinal correspondiente(s) (dichos cambios de secuencia

se denominan en la presente descripción colectivamente "mutaciones de línea germinal"). Un experto en la técnica, que parte de las secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada descritas en la presente descripción, puede producir fácilmente numerosas moléculas de unión a antígeno y que comprenden una o más mutaciones tales como mutaciones de la línea germinal individuales o sus combinaciones. En ciertas modalidades, todos los residuos de CDR y/o el armazón dentro del V_H y/o V_L los dominios se mutan de vuelta a los residuos que se encuentran en la secuencia de línea germinal original a partir de la cual se derivó la molécula de unión a antígeno. En otras modalidades, solo determinados residuos se mutan nuevamente a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, solo los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más del marco y/o residuo(s) de CDR se mutan al(los) residuo(s) correspondiente(s) de una secuencia de línea germinal diferente (es decir,, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la que se derivó originalmente la molécula de unión a antígeno).

Además, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones dentro del marco y/o regiones de CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales se mutan con relación a las secuencias proporcionadas en la presente descripción, o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que ciertos otros residuos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidas, las moléculas de unión a antígeno y que contienen una o más mutaciones se pueden probar fácilmente para una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagónicas o agonísticas mejoradas o mejoradas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Las moléculas de unión a antígeno y obtenidas de esta manera general se abarcan dentro de la presente invención.

En la presente descripción se proporcionan moléculas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR descritas en la presente descripción que tienen una o más sustituciones. En algunos aspectos, las sustituciones son sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, la presente descripción incluye moléculas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB que tienen secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o

menos, 3 o menos, 2 o 1 sustitución de aminoácidos con relación a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR establecidas en las Tablas 1, 3, 5 o 7 en la presente descripción.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio específico de unión a antígeno en la región variable de una molécula de unión a antígeno conocida como parátopo. Un único antígeno puede tener más de un epítopo. Por tanto, diferentes moléculas de unión a antígeno pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce mediante aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítopo lineal es uno que se produce mediante residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En determinadas circunstancias, un epítopo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo en el antígeno.

El término "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento de este, indica que, cuando se alinea óptimamente con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 95 %, y con mayor preferencia al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, como se mide por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o GAP, como se describe más abajo. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinados casos, codificar un polipéptido que tiene la misma o sustancialmente similar secuencia de aminoácidos a la del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Como se aplica a los polipéptidos, el término "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT mediante el uso de pesos de espacios predeterminados, comparten al menos 95 % de identidad de secuencia, aún con mayor preferencia, al menos 98 % o 99 % de identidad de secuencia. En la presente descripción se contemplan sustituciones de aminoácidos que no cambiarán sustancialmente las propiedades funcionales de la molécula multiespecífica de unión a antígeno. En algunos aspectos, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En

general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el por ciento de identidad de secuencia o el grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los expertos en la técnica conocen bien los medios para producir este ajuste. Ver, por ejemplo, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, que se incorpora en la presente descripción como referencia. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas; glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales hidroxialifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato; y (7) las cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores ilustrativos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros. (1992) Science 256: 1443-1445, que se incorpora en la presente descripción como referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250. La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina como identidad de secuencia, se mide típicamente mediante el uso de un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas busca secuencias similares mediante el uso de medidas de similitud que se asignan a diversas sustituciones, delecciones y otras modificaciones, lo que incluye sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como GAP y Bestfit que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos que se relacionan estrechamente, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína de la misma. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también se pueden comparar mediante el uso de FASTA mediante el uso de parámetros predeterminados o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y por ciento de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención

con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, mediante el uso de parámetros predeterminados. Ver, por ejemplo, Altschul y otros. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 y Altschul y otros. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia.

Propiedades de unión de las moléculas de unión a antígeno

Como se usa en la presente descripción, el término "unión" en el contexto de la unión de una molécula de unión a antígeno, inmunoglobulina, fragmento de unión a molécula de unión a antígeno o proteína que contiene Fc a por ejemplo, un antígeno predeterminado, tal como una proteína de superficie celular o fragmento de la misma, típicamente se refiere a una interacción o asociación entre un mínimo de dos entidades o estructuras moleculares, tal como una interacción de unión de molécula de unión a antígeno.

Por ejemplo, la afinidad de unión típicamente corresponde a una K_D un valor de aproximadamente 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos cuando se determina por, por ejemplo, la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore que usa el antígeno como el ligando y la molécula de unión a antígeno, Ig, fragmento de unión a la molécula de unión a antígeno o proteína que contiene Fc como el analito (o antiligando). Las estrategias de unión en base a células, tal como los ensayos de unión de clasificación de células que se activan por fluorescencia (FACS), también se usan de forma rutinaria, y los datos de FACS se correlacionan bien con otros métodos tal como la unión por competencia de radioligandos y SPR (Benedict, CA, *Métodos J Immunol.* 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA y otros, *Métodos J Immunol.* 2005, 302(1-2):68-77).

En consecuencia, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno o la proteína de unión a antígeno de la invención se unen al antígeno predeterminado o a la molécula de superficie celular (receptor) que tiene una afinidad correspondiente a un K_D valor que es al menos diez veces menor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína). De acuerdo con la presente descripción, la afinidad de una molécula de unión a antígeno correspondiente a un K_D valor que es igual o menor que diez veces menor que un antígeno no específico puede considerarse una unión no detectable, sin embargo, tal molécula de unión a antígeno puede emparejarse con un segundo brazo de unión a antígeno para la producción de una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la invención.

El término " K_D " (M) se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de unión

a antígeno de una molécula de unión a antígeno particular, o la constante de equilibrio de disociación de una molécula de unión a antígeno o un fragmento de unión a la molécula de unión a antígeno que se une a un antígeno. Existe una relación inversa entre K_D y la afinidad de unión, por lo tanto, cuanto más pequeño sea K_D valor, el más alto, *es decir*, más fuerte, la afinidad. Por tanto, los términos “afinidad más alta” o “afinidad más fuerte” se relacionan a capacidad más alta para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D más pequeño y, a la inversa, los términos “menor afinidad” o “afinidad más débil” se relacionan con una menor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D más grande. En algunas circunstancias, una mayor afinidad de unión (o K_D) de una molécula particular (por ejemplo molécula de unión a antígeno) a su molécula de pareja interactiva (por ejemplo, antígeno X) en comparación con la afinidad de unión de la molécula (por ejemplo molécula de unión a antígeno) a otra molécula de pareja interactiva (por ejemplo antígeno Y) puede expresarse como una relación de unión determinada al dividir la K más grande K_D valor (afinidad más baja o más débil) por el K más pequeño K_D (más alta, o más fuerte, afinidad), por ejemplo, expresada como 5 o 10 veces mayor afinidad de unión, según sea el caso.

El término " k_d " (s^{-1} o $1/s$) se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción de unión a antígeno de una molécula de unión a antígeno particular, o la constante de velocidad de disociación de una molécula de unión a antígeno o fragmento de unión a la molécula de unión a antígeno. Dicho valor también se denomina como la $k_{apagado}$ valor.

El término " k_a " ($M^{-1} \times sec^{-1}$ o $1/M/s$) se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción particular entre la molécula de unión a antígeno y el antígeno, o la constante de velocidad de asociación de una molécula de unión a antígeno o fragmento de unión a la molécula de unión a antígeno.

El término " K_A " (M^{-1} o $1/M$) se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción de unión a antígeno de una molécula de unión a antígeno particular, o la constante de equilibrio de asociación de una molécula de unión a antígeno o fragmento de unión a la molécula de unión a antígeno. La constante de equilibrio de asociación se obtiene dividiendo la k_a por el k_d .

El término “EC50” o “EC₅₀” se refiere a la concentración efectiva semimáxima, que incluye la concentración de una molécula de unión a antígeno que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición especificado. El EC₅₀ representa esencialmente la concentración de una molécula de unión a antígeno donde se observa el 50 % de su efecto máximo. En ciertas modalidades, el EC₅₀ el valor es igual a la concentración de una molécula de unión a antígeno de la invención que da una unión semimáxima a las células que expresan 4-1BB

o el antígeno asociado con el tumor (por ejemplo, CD38), como se determina por ejemplo, un ensayo de unión FACS. Por tanto, se observa una unión reducida o más débil con un aumento de EC₅₀, o la mitad del valor de concentración efectivo máximo.

En una modalidad, la disminución de la unión se puede definir como un EC₅₀ aumentado
5 concentración de molécula de unión a antígeno que permite la unión a la cantidad de células diana semimáxima.

En otra modalidad, el EC₅₀ valor representa la concentración de una molécula de unión a antígeno de la invención que induce una disminución medio máxima de las células diana por la actividad citotóxica de los linfocitos T. Por tanto, se aumenta la actividad citotóxica (por ejemplo, Se observa
10 una disminución de EC con la muerte de células tumorales mediada por linfocitos T)₅₀, o valor de concentración efectiva media máxima.

Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno

Las moléculas de unión a antígeno de la presente invención se unen tanto a CD38 como a 4-1BB. Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno pueden ser específicas para diferentes epítomos
15 de un polipéptido objetivo o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido objetivo. Ver, por ejemplo, Tutt y otros, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer y otros., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

De acuerdo con ciertas modalidades ilustrativas, la presente invención incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se unen específicamente a 4-1BB y CD38. Tales moléculas
20 pueden denominarse en la presente descripción como, por ejemplo, “anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2” o “anti-CD38/anti-4-1BB 1+2,” o “anti-CD38x4-1BB 1+2” o “CD38x4-1BB 1+2” moléculas multiespecíficas, u otra terminología similar.

La presente descripción incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno en las que un brazo A2 de la inmunoglobulina tiene dos dominios de unión a antígeno que se unen a 4-1BB humano, un
25 dominio “IN” de 4-1BB y un dominio “OUT” de 4-1BB, y el otro brazo A1 de la inmunoglobulina es específico para unirse a CD38 humano. El brazo de unión a 4-1BB puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 3 (anti-4-1BB “IN”) o la Tabla 5 (anti-4-1BB “OUT”) en la presente descripción, en un formato apilado.

En ciertas modalidades, el brazo de unión a 4-1BB se une a 4-1BB humano y facilita la activación
30 de linfocitos T humanos. En ciertas modalidades, el brazo de unión a 4-1BB se une a 4-1BB humano e induce la activación de linfocitos T humanos. En otras modalidades, el brazo de unión a 4-1BB se une a 4-1BB humano e induce la destrucción de células que expresan antígenos asociados con

tumores en el contexto de una molécula de unión a antígenos multiespecífica o multiespecífica. El brazo de unión a CD38 puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se expone en la Tabla 1 en la presente descripción.

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

Como se usa en la presente descripción, la expresión "molécula multiespecífica de unión a antígeno" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno. Cada dominio de unión a antígeno dentro de la molécula multiespecífica de unión a antígeno comprende al menos una CDR que sola, o en combinación con una o más CDR y/o FR adicionales, se une específicamente a un antígeno particular. En el contexto de la presente invención, el primer brazo de unión a antígeno A1 se une específicamente a un primer antígeno (por ejemplo, CD38), y el segundo brazo de unión a antígeno A2 se une específicamente a un segundo y un tercer antígeno (por ejemplo, 4-1BB), distinto del primer antígeno.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se discuten en la presente descripción pueden comprender una región constante de la cadena pesada de IgG humana. En algunos casos, la región constante de la cadena pesada de IgG humana es isotipo IgG1. En algunos casos, la región constante de la cadena pesada de IgG humana es isotipo IgG4. En diversas modalidades, la molécula multiespecífica de unión a antígeno comprende una bisagra quimérica que reduce la unión al receptor Fcγ con relación a una bisagra de tipo salvaje del mismo isotipo.

El primer brazo de unión a antígeno A1 y el segundo brazo de unión a antígeno A2 pueden conectarse de forma directa o indirecta entre sí para formar una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente invención. Alternativamente, el primer brazo de unión a antígeno A1 y el segundo brazo de unión a antígeno A2 pueden conectarse cada uno a un dominio de multimerización separado. La asociación de un dominio de multimerización con otro dominio de multimerización facilita la asociación entre los dos dominios de unión a antígeno, formando de esta manera una molécula multiespecífica de unión a antígeno. Como se usa en la presente descripción, un "dominio

de multimerización" es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido, o aminoácido que tiene la capacidad de asociarse con un segundo dominio de multimerización de la misma o similar estructura o constitución. Por ejemplo, un dominio de multimerización puede ser un polipéptido que comprende un dominio C_{H3} de inmunoglobulina. Un ejemplo no limitativo de un componente de multimerización es una porción Fc de una inmunoglobulina (que comprende un C_{H2} - C_{H3} del dominio), por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como también cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención comprenderán típicamente dos dominios de multimerización, por ejemplo, dos dominios Fc que son cada uno parte individual de una cadena pesada de la molécula de unión a antígeno separada. El primer y el segundo dominio de multimerización pueden ser del mismo isotipo de IgG tal como, por ejemplo, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Alternativamente, el primer y el segundo dominio de multimerización pueden ser de diferentes isotipos de IgG tales como, por ejemplo, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4, etcétera.

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

Cualquier formato o tecnología de la molécula multiespecífica de unión a antígeno puede usarse para fabricar las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno o fragmento de la misma que tiene una primera especificidad de unión a antígeno puede enlazarse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una o más de otras entidades moleculares, tales como otra molécula de unión a antígeno o fragmento de la molécula de unión a antígeno que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno para producir una molécula multiespecífica de unión a antígeno. Los formatos multiespecíficos ilustrativos específicos que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos multiespecíficos de diabody o basados en scFv, fusiones IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, Quadroma, botones en agujeros, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con botones en agujeros, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, cremallera de leucina, Duobody,

IgG1/IgG2, Fab de doble acción (DAF)-IgG y Mab² formatos multiespecíficos (ver, por ejemplo, Klein y otros. 2012, mAbs 4:6, 1-11 y las referencias citadas en los mismos, para una revisión de los formatos anteriores).

En el contexto de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención, los dominios de multimerización, por ejemplo, los dominios Fc, pueden comprender uno o más cambios de aminoácidos (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o sustituciones) en comparación con la versión de tipo salvaje de origen natural del dominio Fc. Por ejemplo, la invención incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden una o más modificaciones en el dominio Fc que da como resultado un dominio Fc modificado que tiene una interacción de unión modificada (por ejemplo, mejorado o disminuido) entre Fc y FcRn. En una modalidad, la molécula multiespecífica de unión a antígeno comprende una modificación en una región CH₂ o una CH₃, en donde la modificación aumenta la afinidad del dominio Fc por FcRn en un entorno ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Los ejemplos no limitativos de tales modificaciones Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, o T), y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una modalidad, la modificación puede comprender una modificación en 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación en 428L, 259I (por ejemplo, V259I), y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación en 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación en 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación en 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación en 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

La presente descripción también incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden una primera CH₃ y una segunda Ig CH₃, en donde la primera y la segunda Ig CH₃ dominios difieren entre sí por al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión de la molécula multiespecífica de unión a antígeno a la Proteína A en comparación con una molécula biespecífica de unión a antígeno que carece de la diferencia de aminoácido. En una modalidad, el primer dominio CH₃ de Ig se une a la proteína A y el segundo dominio CH₃ de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a la proteína A tal como una modificación H95R (según la numeración de exones IMGT; H435R según la numeración de EU).

El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (según IMGT; Y436F según EU). La segunda C_H3 puede comprender además una modificación L105P (por IMGT; L455P por EU). Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 8,586,713. Otras modificaciones que pueden encontrarse dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I por EU) en el caso de moléculas de unión a antígeno IgG1; N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I por EU) en el caso de moléculas de unión a antígeno IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por EU) en el caso de moléculas de unión a antígeno IgG4.

En determinadas modalidades, el dominio Fc puede ser quimérico, que combina secuencias Fc derivadas de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc quimérico puede comprender parte o la totalidad de una C_H2 secuencia derivada de una región C_H2 IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y parte o la totalidad de una C_H3 derivada de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un dominio Fc quimérico también puede contener una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de "bisagra superior", que se deriva de una región bisagra de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, que se combina con una secuencia de "bisagra inferior", que se deriva de una región bisagra de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un ejemplo particular de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno establecidas en la presente descripción comprende, de N- a C- terminal: [IgG4 C_H1] - [bisagra superior de IgG4] - [bisagra inferior de IgG2] - [C_H2 de IgG4] - [C_H3 de IgG4]. Otro ejemplo de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno que se exponen en la presente descripción comprende, de N- a C- terminal: [IgG1 C_H1] - [bisagra superior de IgG1] - [bisagra inferior de IgG2] - [C_H2 de IgG4] - [C_H3 de IgG1]. Estos y otros ejemplos de dominios Fc quiméricos que se pueden incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención se describen en la patente de Estados Unidos núm. 9.359.437, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad. Los dominios Fc quiméricos que tienen estas disposiciones estructurales generales, y variantes de las mismas, pueden tener una unión al receptor Fc alterada, lo que a su vez afecta la función efectora de Fc.

Variantes de secuencia

Las moléculas de unión a antígeno y las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de

aminoácidos en el marco y/o regiones de CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal correspondientes de las que se derivaron los dominios de unión a antígeno individuales. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción con las secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de moléculas de unión a antígenos. Las moléculas de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender dominios de unión a antígeno que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos ilustrativas descritas en la presente descripción, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR se mutan al(los) residuo(s) correspondiente(s) de la secuencia de línea germinal de la que se derivó la molécula de unión a antígeno, o al(los) residuo(s) correspondiente(s) de otra secuencia de línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del(los) residuo(s) de línea germinal correspondiente(s) (dichos cambios de secuencia se denominan en la presente descripción colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la técnica, que parte de las secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada descritas en la presente descripción, puede producir fácilmente numerosas moléculas de unión a antígeno y que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o sus combinaciones. En ciertas modalidades, todos los residuos de CDR y/o el armazón dentro del V_H y/o V_L los dominios se mutan de regreso a los residuos que se encuentran en la secuencia de línea germinal original de la que se derivó originalmente el dominio de unión a antígeno. En otras modalidades, solo determinados residuos se mutan nuevamente a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, solo los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más del marco y/o residuo(s) de CDR se mutan al(los) residuo(s) correspondiente(s) de una secuencia de línea germinal diferente (es decir., una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la que se derivó originalmente el dominio de unión a antígeno).

Además, los dominios de unión a antígeno pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro del marco y/o regiones de CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que ciertos otros residuos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los dominios de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea

germinal se pueden probar fácilmente para una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagónicas o agonísticas mejoradas o mejoradas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno que se obtienen de esta manera general se abarcan dentro de la presente invención.

Unión dependiente de pH

La presente invención incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB, con características de unión dependientes del pH. Por ejemplo, un brazo de unión a antígeno anti-CD38 de la presente invención puede exhibir una unión reducida a CD38 a pH ácido en comparación con pH neutro. Alternativamente, los brazos de unión a antígeno anti-CD38 de la invención pueden exhibir una unión mejorada a CD38 a pH ácido en comparación con pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH menores de aproximadamente 6.2, por ejemplo, aproximadamente 6.0, 5.95, 5.9, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0 o menos. Como se usa en la presente descripción, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 7.4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7.0, 7.05, 7.1, 7.15, 7.2, 7.25, 7.3, 7.35, y 7.4.

En ciertos casos, "la unión reducida ... a pH ácido en comparación con pH neutro" se expresa en términos de una relación de la K_D valor de la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno a pH ácido a la K_D valor de la unión de la molécula de unión a antígeno a su antígeno a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno o puede considerarse que exhibe "unión reducida a CD38 a pH ácido en comparación con pH neutro" con fines de la presente invención si la molécula de unión a antígeno o exhibe una $K_{\text{ácido/neutro}}$ relación de aproximadamente 3,0 o mayor. En ciertas modalidades ilustrativas, el $K_{\text{ácido/neutro}}$ la relación de un antígeno de unión a la molécula o de la presente invención puede ser aproximadamente 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 100.0 o más.

Pueden obtenerse moléculas de unión a antígeno con características de unión dependientes del pH, por ejemplo, al tamizar una población de moléculas de unión a antígeno para una unión reducida (o mejorada) a un antígeno particular a pH ácido en comparación con pH neutro. Adicionalmente, las modificaciones del dominio de unión a antígeno a nivel de aminoácidos pueden producir moléculas de unión a antígeno con características dependientes del pH. Por ejemplo, al sustituir uno o más aminoácidos de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, dentro de un CDR) con un residuo de

histidina, puede obtenerse una molécula de unión a antígeno con una unión al antígeno reducida a pH ácido con relación al pH neutro.

Moléculas de unión a antígeno que comprenden variantes de Fc

De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, se proporcionan moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB, que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que mejoran o disminuyen la unión de la molécula de unión a antígeno al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye moléculas de unión a antígeno que comprenden una mutación en la CH2 o una CH3 de la región del dominio Fc, en donde la(s) mutación(es) aumenta(n) la afinidad del dominio Fc por FcRn en un entorno ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.0). Tales mutaciones pueden dar como resultado un aumento en la vida media sérica de la molécula de unión a antígeno cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitativos de tales modificaciones Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, o T), y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una modalidad, la modificación puede comprender una modificación en 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación en 428L, 259I (por ejemplo, V259I), y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación en 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación en 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación en 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación en 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

Por ejemplo, la presente descripción incluye moléculas multiespecíficas de unión a antígeno 1+2 anti-CD38 x anti-4-1BB, que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Todas las posibles combinaciones de las mutaciones del dominio Fc anteriores, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de la molécula de unión a antígeno divulgados en la presente descripción, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Características biológicas de las moléculas de unión a antígeno y las moléculas multiespecíficas de

unión a antígeno

En la presente descripción se proporcionan moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB que se unen a CD38 expresado en células MOLP8. Como se muestra en el Ejemplo 6, se observó una unión dependiente de la dosis de los anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB 1+2 (REGN7633, REGN7647 y REGN7650) y 1+1 (REGN7150) en presencia de células MOLP8, con una gMFI máximo que oscila entre 8.8×10^4 a 1.4×10^5 y EC_{50} s que varían de 4.23×10^{-9} M a 9.27×10^{-9} M.

En la presente descripción se proporcionan moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB que se unen a 4-1BB expresado en células HEK293 que se modifican genéticamente para expresar 4-1BB. Se observó una unión dependiente de la dosis de los anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB 1+2 (REGN7633, REGN7647 y REGN7650) y 1+1 (REGN7150) en presencia de células HEK293/h4-1BB, con una gMFI máximo que oscila entre 7.4×10^5 a 2.4×10^6 y EC_{50} s que varían de 1.47×10^{-8} M a 9.97×10^{-10} M.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno CD38x4-1BB (1+1 y 1+2) imitan el ligando natural de 4-1BB al enlazar las células diana CD38+ con los linfocitos T positivos para el receptor 4-1BB. Al hacerlo, los constructos proporcionan “señal 2” y mejoran la activación de los linfocitos T en presencia de una “señal 1” proporcionada por un anticuerpo biespecífico asociado a tumor (TAA) x CD3 o una respuesta alogénica proporcionada por el APC. Como se muestra en el Ejemplo 7, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción, En presencia de la diana y la “señal 1” (proporcionada por REGN1979), se condujo a una mayor respuesta máxima de IL-2 y mayor potencia que los controles de isotipo coincidentes en un ensayo de activación de células T. Como se muestra en el Ejemplo 8, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno tenían un aumento dependiente de la dosis en IL-2 e IFN γ y mayor potencia incluso cuando se varió la longitud del enlazador entre el Fab2 y el Fab3.

De acuerdo con ciertas modalidades, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción activan el receptor 4-1BB y estimulan la actividad 4-1BB en presencia de células diana que expresan CD38 como se demuestra en un ensayo de reportero diseñado. Como se muestra en el Ejemplo 9, la activación de 4-1BB se logró mediante el uso de constructos con diferentes longitudes de enlazador.

En ciertas modalidades, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción provocan aumentos dependientes de la dosis en la liberación de IL-2 e IFN γ . Como se muestra en el ejemplo 10, en presencia de células NALM-6 alogénicas o células NALM-6

modificadas para expresar PD-L1, el tratamiento con anticuerpos CD38x4-1BB 1+2 (REGN7633, REGN7647 y REGN7650) dio lugar a aumentos dependientes de la dosis en la liberación de IL-2 e IFN γ y mayor potencia.

De acuerdo con ciertas modalidades, el tratamiento con las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno cuando se administran en combinación con anticuerpos biespecíficos BCMAxCD3, in vivo, da como resultado una eficacia antitumoral más potente que es superior a la de cualquier tratamiento solo. En el Ejemplo 11, NOD.Cg-Prkdc inmunodeficiente^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) ratones inyectados por vía intraperitoneal con 4×10^6 a las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se administraron células humanas de mieloma múltiple. Después de recibir los linfocitos Tumorales, los ratones se trataron con Ab biespecífico de control de unión a CD3 o un BCMAxCD3 (REGN5458) a 0.4 mg/kg, en combinación con un Ab biespecífico de control de unión a 4-1BB (formato 1+2) o un CD38x4-1BB (formato 1+2; REGN9686) a 4 mg/kg. Las combinaciones de tratamiento se administraron dos veces más los días 7 y 14, para un total de tres dosis. El tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb demostró una eficacia antitumoral combinada más potente superior a cualquier terapia sola.

Maapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

El epítomo en CD38 y/o 4-1BB al que se unen las moléculas de unión a antígeno de la presente invención puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una respectiva proteína de CD38 o 4-1BB. Alternativamente, el epítomo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) de CD38 o 4-1BB.

El término "epítomo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de unión a antígeno p.m. conocido como parátomo. Un único antígeno puede tener más de un epítomo.

Por tanto, diferentes moléculas de unión a antígeno pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítomos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítomo conformacional se produce mediante aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítomo lineal es uno que se produce mediante residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En ciertas circunstancias, un epítomo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo en el antígeno.

Pueden usarse varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica para determinar si un dominio de unión a antígeno de una molécula de unión a antígeno "interactúa con uno o más aminoácidos"

dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ilustrativas incluyen, por ejemplo, el ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como se describe en *Antigen binding molecules*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis de mutación de escaneo de alanina, análisis de manchas de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) y análisis de escisión de péptidos. Además, se pueden emplear métodos tales como escisión del epítipo, extracción del epítipo y modificación química de los antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un dominio de unión a antígeno de una molécula de unión a antígeno es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica el marcaje con deuterio de la proteína de interés, seguido de la unión de la molécula de unión a antígeno a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de unión a proteína/antígeno se transfiere al agua para permitir que se produzca el intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los residuos, excepto en los residuos protegidos por la molécula de unión a antígeno (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación de la molécula de unión a antígeno, la proteína diana se somete a la escisión de proteasa y al análisis de espectrometría de masas, revelando de esta manera los residuos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa la molécula de unión a antígeno. Ver, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. La cristalografía de rayos X del complejo de molécula de unión a antígeno/antígeno también puede usarse con fines de mapeo de epítipos.

En la presente descripción se proporcionan los brazos de unión a antígeno anti-CD38 A1 que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los brazos de unión a antígeno ilustrativos específicos que se describen en la presente descripción (por ejemplo, moléculas de unión a antígeno que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 en la presente descripción). Igualmente, la presente invención también incluye los brazos de unión a antígeno anti-CD38 A1 que compiten por la unión a CD38 con cualquiera de los brazos de unión a antígeno ilustrativos específicos que se describen en la presente descripción (por ejemplo, moléculas de unión a antígeno que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 en la presente descripción).

En la presente descripción se proporcionan brazos de unión a antígeno 4-1BB A2 que comprenden un primer dominio de unión a antígeno (R1) y un segundo dominio de unión a antígeno (R2), donde R1 o R2 se unen al mismo epítipo que cualquiera de los dominios de unión a antígeno ilustrativos

específicos que se describen en la presente descripción (por ejemplo, brazos de unión a antígeno que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 3 o la Tabla 5 en la presente descripción). Igualmente, la presente invención también incluye moléculas de unión a antígeno anti-4-1BB que compiten por la unión a 4-1BB con cualquiera de los dominios de unión a antígeno ilustrativos específicos que se describen en la presente descripción (por ejemplo, brazos de unión a antígeno que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 3 o la Tabla 5 en la presente descripción).

Igualmente, en la presente descripción se proporcionan moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano (Fab1), y un segundo brazo de unión a antígeno que se une específicamente a 4-1BB humano (Fab 2 y Fab 3), en donde el primer dominio de unión a antígeno compite por la unión a CD38 con cualquiera de los brazos de unión a antígeno específicos ilustrativos que se unen a CD38 descritos en la presente descripción, y/o en donde el segundo brazo de unión a antígeno compite por la unión a 4-1BB con cualquiera de los Fab de unión a antígeno específicos de 4-1BB ilustrativos que se describen en la presente descripción.

Se puede determinar fácilmente si una molécula de unión a antígeno particular (por ejemplo, la molécula de unión a antígeno 1+2 multiespecífica) o fragmento de unión a antígeno de la misma se une al mismo epítipo que, o compite por la unión con, una molécula de unión a antígeno de referencia de la presente invención mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica.

Por ejemplo, para determinar si una molécula de unión a antígeno de prueba se une al mismo epítipo en CD38 (o 4-1BB) como una molécula multiespecífica de unión a antígeno de referencia de la presente invención, se permite primero que la molécula multiespecífica de referencia se una a una proteína CD38 (o proteína 4-1BB). A continuación, se evalúa la capacidad de una molécula de unión a antígeno de prueba para unirse a la molécula CD38 (o 4-1BB). Si la molécula de unión a antígeno de prueba es capaz de unirse a CD38 (o 4-1BB) después de la unión de saturación con la molécula multiespecífica de unión a antígeno de referencia, se puede concluir que la molécula de unión a antígeno de prueba se une a un epítipo diferente de CD38 (o 4-1BB) que la molécula multiespecífica de unión a antígeno de referencia. Por otro lado, si la molécula de unión a antígeno de prueba no es capaz de unirse a la molécula CD38 (o 4-1BB) después de la unión de saturación con la molécula multiespecífica de unión a antígeno de referencia, entonces la molécula de unión a antígeno de prueba puede unirse al mismo epítipo de CD38 (o 4-1BB) como el epítipo unido por la molécula multiespecífica de unión a antígeno de referencia de la invención. La experimentación de rutina

adicional (por ejemplo, pueden llevarse a cabo análisis de unión y mutación de péptidos) para confirmar si la falta de unión observada de la molécula de unión a antígeno de prueba se debe, de hecho, a la unión al mismo epítipo que la molécula multiespecífica de unión a antígeno de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo se pueden realizar mediante el uso de ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión a moléculas de unión a antígenos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica. De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo (o superpuesto) epítipo si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de una proteína de unión a antígeno inhibe la unión de la otra en al menos un 50 % pero preferentemente un 75 %, un 90 % o incluso un 99 % como se mide en un ensayo de unión competitiva (ver, por ejemplo, Junghans y otros, Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Alternativamente, se considera que dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reducen o eliminan la unión de la otra. Se considera que dos proteínas de unión a antígeno tienen "epítopos superpuestos" si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reduce o elimina la unión de la otra.

Para determinar si una molécula de unión a antígeno o dominio de unión a antígeno de la misma compete por la unión con una molécula de unión a antígeno de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que la molécula de unión a antígeno de referencia se una a una proteína CD38 (o proteína 4-1BB) en condiciones de saturación seguido de la evaluación de la unión de la molécula de unión a antígeno de prueba a la molécula CD38 (o 4-1BB). En una segunda orientación, se permite que la molécula de unión a antígeno de prueba se una a una molécula CD38 (o 4-1BB) en condiciones de saturación seguido de la evaluación de la unión de la molécula de unión a antígeno de referencia a la molécula CD38 (o 4-1BB). Si, en ambas orientaciones, solo la primera molécula de unión a antígeno (saturante) es capaz de unirse a la molécula CD38 (o 4-1BB), entonces se concluye que la molécula de unión a antígeno de prueba y la molécula de unión a antígeno de referencia compiten por unirse a CD38 (o 4-1BB). Como apreciará un experto en la técnica, una molécula de unión a antígeno que compete por la unión con una molécula de unión a antígeno de referencia puede no unirse necesariamente al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión de la molécula de unión a antígeno de referencia al unirse a un

epítopo superpuesto o adyacente.

Preparación de dominios de unión a antígeno y construcción de moléculas multiespecíficas

Los dominios de unión a antígeno específicos para antígenos particulares se pueden preparar por cualquier tecnología de generación de moléculas de unión a antígeno conocida en la técnica. Una vez obtenidos, los diferentes dominios de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción, específicos para dos antígenos diferentes (por ejemplo, CD38 y 4-1BB), pueden disponerse apropiadamente entre sí para producir una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente invención mediante el uso de métodos de rutina. (En la presente descripción se proporciona una discusión de formatos ilustrativos de moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que pueden usarse para construir las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención). En ciertas modalidades, uno o más de los componentes individuales (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras) de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la invención se derivan de moléculas de unión a antígeno quiméricas, humanizadas o completamente humanas. Los métodos para fabricar tales moléculas de unión a antígenos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una o más de las cadenas pesadas y/o ligeras de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención se pueden preparar mediante el uso de la tecnología VELOCIMMUNE™. Mediante el uso de la tecnología VELOCIMMUNE™ (o cualquier otra tecnología de unión a antígenos humanos), se generan moléculas de unión a antígenos quiméricas de alta afinidad para un antígeno particular (por ejemplo, CD38 o 4-1BB) se aíslan inicialmente con una región variable humana y una región constante de ratón. Las moléculas de unión a antígeno se caracterizan y seleccionan por características convenientes, que incluyen afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas que se pueden incorporar en las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención.

Los animales genéticamente modificados pueden usarse para fabricar moléculas de unión a antígenos humanos multiespecíficas. Por ejemplo, puede usarse un ratón modificado genéticamente que es incapaz de reorganizar y expresar una secuencia variable de la cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón, en donde el ratón expresa sólo uno o dos dominios variables de la cadena ligera humana que se codifican por secuencias de inmunoglobulina humana que se enlazan operativamente al gen constante kappa de ratón en el locus kappa endógeno de ratón. Estos ratones genéticamente modificados pueden usarse para producir moléculas de unión a antígenos completamente humanas que comprenden dos cadenas pesadas diferentes que se asocian con una cadena ligera idéntica que

comprende un dominio variable derivado de uno de dos segmentos de genes de la región variable de la cadena ligera humana diferentes. (Ver, por ejemplo, el documento US 2011/0195454). Totalmente humano se refiere a una molécula de unión a antígeno, o fragmento de unión a antígeno de la misma, o dominio de inmunoglobulina de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un ADN derivado de una secuencia humana en toda la longitud de cada polipéptido de la molécula de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno de la misma, o dominio de inmunoglobulina de la misma. En algunos casos, la secuencia completamente humana se deriva de una proteína endógena a un ser humano. En otros casos, la proteína o secuencia de proteína completamente humana comprende una secuencia quimérica en donde cada secuencia de componente se deriva de una secuencia humana. Sin limitarse a ninguna teoría, las proteínas quiméricas o secuencias quiméricas se diseñan generalmente para minimizar la creación de epítomos inmunogénicos en las uniones de las secuencias componentes, por ejemplo, en comparación con cualquier región o dominio de inmunoglobulina humana de tipo salvaje.

Bioequivalentes

En la presente descripción se proporcionan moléculas de unión a antígeno que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de las moléculas ilustrativas descritas en la presente descripción, pero que conservan la capacidad de unirse a CD38 y/o 4-1BB. Tales moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero exhiben una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno descritas.

Las moléculas de unión a antígeno que son bioequivalentes a cualquiera de las moléculas de unión a antígeno ilustrativas expuestas en la presente descripción son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea en dosis única o en dosis múltiples. Algunas proteínas de unión a antígeno se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para la obtención de concentraciones efectivas del fármaco corporal en, por ejemplo, uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacéutico particular estudiado.

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

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, que incluye un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o la disminución de la efectividad, en comparación con la continuación de la
5 terapia sin tal cambio.

En una modalidad, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan mediante un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la afección o afecciones de uso, en la medida en que tales mecanismos se conocen.

La bioequivalencia puede demostrarse mediante métodos in vivo e in vitro. Las medidas de
10 bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba in vivo en humanos u otros mamíferos, en la que se mide la concentración de la molécula de unión a antígeno o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico como una función del tiempo; (b) una prueba in vitro que se correlaciona con y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad in vivo en humanos; (c) una prueba in vivo en humanos u otros mamíferos en la que el efecto farmacológico
15 agudo apropiado de la molécula de unión a antígeno (o su objetivo) se mide como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de una proteína de unión a antígeno.

Las variantes bioequivalentes de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno ilustrativas que se establecen en la presente descripción pueden construirse, por ejemplo, mediante la modalidad de
20 diversas sustituciones de residuos o secuencias o mediante la eliminación de residuos o secuencias terminales o internas no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica pueden eliminarse o reemplazarse con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, las proteínas de unión a antígeno
25 bioequivalentes pueden incluir variantes de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno ilustrativas expuestas en la presente descripción que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glucosilación de las moléculas, por ejemplo, mutaciones que eliminan o eliminan la glucosilación.

Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies

De acuerdo con ciertas modalidades de la invención, se proporcionan moléculas de unión a antígeno
30 que se unen a 4-1BB humano pero no a 4-1BB de otras especies. También se proporcionan moléculas de unión a antígeno que se unen a CD38 humano, pero no a CD38 de otras especies. La presente

invención también incluye moléculas de unión a antígeno que se unen a 4-1BB humano y a CD38 de una o más especies no humanas; y/o moléculas de unión a antígeno que se unen a 4-1BB humano y a 4-1BB de una o más especies no humanas.

De acuerdo con ciertas modalidades ilustrativas de la invención, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que se unen a CD38 humano y/o 4-1BB humano y pueden unirse o no unirse, como sea el caso, a uno o más de CD38 y/o 4-1BB de ratón, rata, cobaya, hámster, gerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, canguro, marmoset, rhesus o chimpancé. Por ejemplo, en modalidades ilustrativas particulares de lo divulgado en la presente descripción, se proporcionan moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden un primer brazo de unión a antígeno que se une a CD38 humano o CD38 de cynomolgus, y un segundo brazo de unión a antígeno que comprende un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno, en donde el segundo brazo de unión a antígeno se une específicamente a 4-1BB humano, o moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que comprenden un segundo brazo de unión a antígeno que comprende un primer y segundo dominio de unión a antígeno que se unen a 4-1BB humano y/o 4-1BB de cynomolgus, y un primer brazo de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 humano.

Formulación terapéutica y administración

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

La dosis de la molécula multiespecífica de unión a antígeno administrada a un paciente puede variar en función de la edad y el tamaño del paciente, la enfermedad diana, las afecciones, la vía de

administración y similares. La dosis preferida se calcula típicamente de acuerdo con el peso corporal o el área de superficie corporal. Cuando una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente invención se usa con fines terapéuticos en un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar por vía intravenosa la molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente invención normalmente en una dosis única de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, con mayor preferencia de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0.03 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. En dependencia de la gravedad de la afección, puede ajustarse la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosis y los horarios efectivos para administrar una molécula multiespecífica de unión a antígeno pueden determinarse empíricamente; por ejemplo, el progreso del paciente se puede monitorear mediante una evaluación periódica, y la dosis se ajusta en consecuencia. Además, el escalado de la dosificación entre especies puede realizarse mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti y otros, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu y otros, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de un bolo, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, la mucosa oral, la mucosa rectal e intestinal, etcétera), y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede suministrarse por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto al suministro subcutáneo, un dispositivo de suministro tipo pluma tiene fácilmente aplicaciones en el suministro de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de suministro tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de suministro tipo pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho se encuentra vacío, el cartucho vacío se puede desechar y reemplazar fácilmente con un nuevo cartucho

que contiene la composición farmacéutica. Luego, el dispositivo de suministro tipo pluma puede reutilizarse. En un dispositivo de suministro tipo pluma desechable, no existe un cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de suministro tipo pluma desechable viene cargado previamente con la composición farmacéutica que se mantiene en un depósito dentro del dispositivo.

5 Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, todo el dispositivo se desecha.

Varios dispositivos de suministro de autoinyección y de tipo pluma reutilizables tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX
10 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (Aanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania), por mencionar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de suministro de
15 tipo pluma desechables que tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), la FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y la KWIKPEN™ (Eli Lilly), el SURECLICK™ Autoinyector (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.) y el HUMIRA™ Pluma (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar solo
20 algunos.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, puede usarse una bomba (ver Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos; ver, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca
25 Raton, Florida. Aún en otra modalidad, puede colocarse un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana de la composición, y se requiere, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, páginas 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión por Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

30 Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones de goteo, etcétera. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las

preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, al disolver, suspender o emulsionar la molécula de unión a antígeno o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso que se usa convencionalmente para las inyecciones. Como medio acuoso para las inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etcétera, que puede usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un surfactante no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etcétera. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección que se prepara, por tanto, se llena preferentemente en una ampolla apropiada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Tales formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etcétera. La cantidad de la citada molécula de unión a antígeno contenida es generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación en una unidad de dosis; especialmente en la forma de inyección, se prefiere que la citada molécula de unión a antígeno esté contenida en aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas de dosificación. En algunas modalidades, la unidad de dosis puede ser hasta aproximadamente 750 mg, 800 mg, 900 mg o 1000 mg.

Usos terapéuticos de las moléculas de unión a antígeno

La presente invención incluye métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica de una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 y 4-1BB. La composición terapéutica puede comprender cualquiera de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno como se describe en la presente descripción y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, la expresión "un sujeto que lo necesita" significa un animal humano o no humano que exhibe uno o más síntomas o indicios de cáncer (por ejemplo, un sujeto que expresa un tumor o padece de cualquiera de los tipos de cáncer que se mencionan en la presente descripción más abajo), o quien de cualquier otra manera se beneficiaría de una inhibición o reducción en la actividad de CD38 o de un agotamiento de las células CD38+ (por ejemplo, células de mieloma múltiple).

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la invención (y las composiciones terapéuticas que comprenden las mismas) son útiles, entre otros, para tratar cualquier enfermedad o trastorno en el que la estimulación, activación y/o direccionamiento de una respuesta inmunitaria sería beneficioso. En particular, las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2 de la presente invención pueden usarse para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado o mediado por la expresión o actividad de CD38 y/o BCMA o la proliferación de células CD38+ y/o BCMA+. El mecanismo de acción por el que se alcanzan los métodos terapéuticos de la invención incluye la destrucción de las células que expresan CD38 en presencia de células efectoras, por ejemplo, por CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis, o por una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan CD38 que pueden inhibirse o eliminarse mediante el uso de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la invención incluyen, por ejemplo, células de mieloma múltiple.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente descripción pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD38, que incluye, por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia de linfocitos B, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma, adenocarcinoma ductal pancreático, glioma o cáncer de mama, u otro cáncer caracterizado en parte por tener células CD38+.

De acuerdo con ciertas modalidades, las moléculas de unión a antígeno 1+2 anti-CD38 x anti-4-1BB son útiles para inhibir el crecimiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto. En algunos aspectos, el tumor de células plasmáticas es un mieloma múltiple.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente descripción pueden usarse para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto. El tumor se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, linfoma, leucemia de linfocitos B, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma, adenocarcinoma ductal pancreático, glioma o cáncer de mama, u otro cáncer caracterizado en parte por tener células CD38+.

De acuerdo con ciertas modalidades, las moléculas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2 son útiles para tratar células tumorales que expresan, por ejemplo, BCMA o CD20. Las moléculas de unión a antígeno que se proporcionan en la presente descripción también pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de BCMA, que incluye, por ejemplo, un cáncer que incluye mieloma múltiple u otros cánceres de linfocitos B o células plasmáticas, tales como la macroglobulinemia de Waldenström, el linfoma de Burkitt y el linfoma difuso de linfocitos B grandes, el linfoma de Hodgkin, la leucemia linfocítica crónica, el linfoma folicular, el linfoma de

células de manto, el linfoma de zona marginal, el linfoma linfoplasmocítico y el linfoma de Hodgkin. De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, las moléculas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB son útiles para tratar a un paciente afectado por mieloma múltiple. De acuerdo con otras modalidades relacionadas de la invención, se proporcionan los métodos que comprenden

5 administrar una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB que se proporciona en la presente descripción en combinación con una molécula de unión a antígeno anti-BCMA, o una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-BCMA x anti-CD3, o una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD20 x anti-CD3, o una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD28 x anti-4-1BB como se describe en la presente descripción a un paciente que

10 padece de células cancerosas que expresan BCMA o CD20. Los métodos analíticos/de diagnóstico conocidos en la técnica, tales como el escaneo del tumor, etc., pueden usarse para determinar si un paciente alberga mieloma múltiple u otro cáncer de linaje de linfocitos B.

En algunas modalidades, una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB que se proporciona en la presente descripción puede administrarse en combinación con un segundo

15 agente terapéutico o régimen terapéutico que comprende un fármaco quimioterápico, alquilantes de ADN, inmunomoduladores, inhibidores del proteasoma, inhibidores de la histona deacetilasa, radioterapia, un trasplante de células madre, un anticuerpo biespecífico diferente que interactúa con un antígeno diferente de la superficie de la célula tumoral y un antígeno de células T o células inmunitarias, un conjugado de fármaco de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico conjugado con un

20 agente antitumoral, un inhibidor de PD-1 (tal como un anticuerpo anti-PD-1, por ejemplo, cemiplimab), un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de punto de control CTLA-4, o sus combinaciones.

La presente invención también incluye métodos para tratar el cáncer residual en un sujeto. Como se usa en la presente descripción, el término "cáncer residual" significa la existencia o persistencia de

25 una o más células cancerosas en un sujeto seguido del tratamiento con una terapia antitumoral.

De acuerdo con ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD38 (por ejemplo, mieloma múltiple) que comprende administrar una o más de las moléculas de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB 1+2 descritas en la presente descripción a un sujeto después de que se determina que el sujeto tiene

30 mieloma múltiple. Por ejemplo, la presente invención incluye métodos para tratar el mieloma múltiple que comprende administrar a un paciente una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB, durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3

semanas o 4 semanas, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 1 año o más después de que el sujeto haya recibido otra inmunoterapia o quimioterapia.

Terapias de combinación y formulaciones

La presente invención proporciona métodos que comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno ilustrativas y las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se describen en la presente descripción en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales ilustrativos que pueden combinarse terapéuticamente o administrarse en combinación con una molécula de unión a antígeno de la presente invención incluyen, por ejemplo, un agente antitumoral (por ejemplo, agentes quimioterápicos que incluyen melfalan, vincristina (Oncovin), ciclofosfamida (Cytotoxan), etopósido (VP-16), doxorubicina (Adriamicina), doxorubicina liposomal (Doxil), obendamustina (Treanda) o cualquier otro conocido por ser efectivo en el tratamiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto.). En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico comprende esteroides. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico comprende terapias dirigidas que incluyen talidomida, lenalidomida, y bortezomib, que son terapias aprobadas para tratar a pacientes con diagnóstico reciente. La lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, panobinostat, ixazomib, elotuzumab y daratumumab son ejemplos de un segundo agente terapéutico efectivo para tratar el mieloma recurrente.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es una molécula biespecífica de unión a antígeno anti-BCMAxCD3. Las moléculas de unión a antígenos biespecíficas anti-BCMAxCD3 ilustrativas se divulgan en el documento de Estados Unidos 2020/0024356 incorporado por referencia en la presente descripción. Una molécula biespecífica de unión a antígeno anti-BCMAxCD3 ilustrativa, como se describe en el documento Estados Unidos 2020/0024356, es REGN5458. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es una molécula biespecífica de unión a antígeno anti-CD20xCD3. Las moléculas biespecíficas de unión a antígeno anti-CD20xCD3 ilustrativas se divulgan en la patente de Estados Unidos Núm. 9.657.102, que se incorpora como referencia en la presente descripción. Una molécula biespecífica de unión a antígeno anti-CD20xCD3 ilustrativa es REGN1979 (patente de Estados Unidos 9.657.102).

En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico es un régimen que comprende radioterapia o un trasplante de células madre. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un agente inmunomodulador. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor de proteasoma, lo que incluye bortezomib (Velcade), carfilzomib (Kyprolis), ixazomib

(Ninlaro). En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor de la histona deacetilasa tal como panobinostat (Farydak). En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un anticuerpo monoclonal, un conjugado de fármaco y anticuerpo, una molécula multiespecífica de unión a antígeno/biespecífica/monoespecífica conjugada a un agente antitumoral, un inhibidor de punto de control, un virus oncolítico, una vacuna contra el cáncer, un CAR-T, o sus combinaciones. Otros agentes que pueden administrarse de manera beneficiosa en combinación con las moléculas de unión a antígeno de la invención incluyen inhibidores de citocinas, incluidos los inhibidores de citocinas de moléculas pequeñas y las moléculas de unión a antígeno que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, o a sus respectivos receptores. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención (por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula multiespecífica de unión a antígeno anti-CD38 x anti-4-1BB como se describe en la presente descripción) también pueden administrarse como parte de un régimen terapéutico que comprende una o más combinaciones terapéuticas seleccionadas de una molécula de unión a antígeno monoclonal distinta de las descritas en la presente descripción, que puede interactuar con un antígeno diferente en la superficie de la célula plasmática, una molécula multiespecífica de unión a antígeno, que tiene un brazo que se une a un antígeno en la superficie de la célula tumoral y el otro brazo se une a un antígeno en una célula T, un conjugado de fármaco de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor de punto de control, por ejemplo, uno que se dirige a, PD-1 o CTLA-4, o sus combinaciones. En ciertas modalidades, los inhibidores de puntos de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-1, tales como pembrolizumab (Keytruda), nivolumab (Opdivo) o cemiplimab (REGN2810; Libtayo). En ciertas modalidades, los inhibidores de puntos de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-L1, tales como atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio) o Durvalumab (Imfinzi). En ciertas modalidades, los inhibidores de puntos de control pueden seleccionarse de inhibidores de CTLA-4, tales como ipilimumab (Yervoy). Otras combinaciones que pueden usarse junto con una molécula de unión a antígeno de la invención se describen anteriormente.

La presente invención también incluye combinaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno mencionadas en la presente descripción y un inhibidor de uno o más de VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroepéptido o cualquiera de las citocinas antes mencionadas, en donde el inhibidor es un aptámero,

una molécula antisentido, un ribozima, un siARN, un peptidobod, un nanobod o un fragmento de molécula de unión a antígeno (por ejemplo, fragmento Fab; F(ab')₂ fragmento; fragmento Fd; fragmento Fv; scFv; fragmento dAb; u otras moléculas manipuladas, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimo). Las moléculas de unión a antígeno de la invención también pueden administrarse y/o coformularse en combinación con antivirales, antibióticos, analgésicos, corticoesteroides y/o AINE. Las moléculas de unión a antígeno de la invención también pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento que también incluye el tratamiento con radiación y/o la quimioterapia convencional.

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

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que una molécula de unión a antígeno de la presente invención se coformula con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte en la presente descripción.

Regímenes de administración

De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, se administran múltiples dosis de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, una molécula multiespecífica de unión a antígeno que se une específicamente a CD38 y 4-1BB) puede administrarse a un sujeto durante un período de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la invención. Como se usa en la presente descripción, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de una molécula de unión a antígeno se administra al sujeto en un punto diferente en el tiempo, por ejemplo, en diferentes días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una única dosis inicial de una molécula de unión a antígeno, seguida de una o más dosis secundarias de la molécula de unión a antígeno, y opcionalmente seguida de una o más dosis terciarias de la molécula de unión a antígeno.

Los términos "dosis inicial", "dosis secundarias" y "dosis terciarias" se refieren a la secuencia temporal de administración de la molécula de unión a antígeno de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (referida, además, como

la "dosis inicial"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener todas la misma cantidad de la molécula de unión a antígeno, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración.

5 En ciertas modalidades, sin embargo, la cantidad de una molécula de unión a antígeno contenida en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varía entre sí (por ejemplo, ajustado hacia arriba o hacia abajo según corresponda) durante el transcurso del tratamiento. En determinadas modalidades, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5) dosis se administran al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguido por dosis subsecuentes que se administran con menos frecuencia (por
10 ejemplo, "dosis de mantenimiento").

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

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un
20 paciente cualquier número de dosis secundarias y/o terciarias de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno 1+2 multiespecífica que se une específicamente a CD38 y 4-1BB). Por ejemplo, en determinadas modalidades, solo se administra al paciente una única dosis secundaria. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis secundarias. Igualmente, en determinadas modalidades, solo se administra al
25 paciente una única dosis terciaria. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis terciarias.

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

inmediatamente anterior. Alternativamente, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar durante el transcurso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también se puede ajustar durante el transcurso del tratamiento por un médico en dependencia de las necesidades del paciente individual seguido del examen clínico.

5 Usos de diagnóstico de las moléculas de unión a antígeno

Las moléculas de unión a antígeno anti-CD38 descritas en la presente descripción pueden usarse para detectar y/o medir CD38, o células que expresan CD38 en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Por ejemplo, puede usarse una molécula de unión a antígeno anti-CD38, o fragmento de la misma, para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, subexpresión, falta de expresión, etc.) de CD38. Los ensayos de diagnóstico ilustrativos para CD38 pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con una molécula de unión a antígeno anti-CD38 descrita en la presente descripción, en donde la molécula de unión a antígeno anti-CD38 se etiqueta con una etiqueta detectable o molécula reportera. Alternativamente, puede usarse una molécula de unión a antígeno anti-CD38 sin etiquetar en aplicaciones de diagnóstico en combinación con una molécula de unión a antígeno secundaria que a su vez está etiquetada de manera detectable. La etiqueta detectable o molécula reportera puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, o rodamina; o una enzima tal como alcalina fosfatasa, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, o luciferasa. Otro uso diagnóstico ilustrativo de las moléculas de unión a antígeno anti-CD38 de la invención incluye ^{89}Zr -desferrioxamina marcada, moléculas de unión a antígenos con el propósito de la identificación y seguimiento no invasivos de células tumorales en un sujeto (por ejemplo, tomografía por emisión de positrones (PET) imágenes). (Ver, por ejemplo, Tavare, R. y otros. Cancer Res. 1 de enero de 2016; 76(1): 73-82; y Azad, BB. y otros. Oncotarget. 15 de marzo de 2016; 7(11): 12344-58.) Los ensayos ilustrativos específicos que pueden usarse para detectar o medir CD38 en una muestra incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoanálisis (RIA), y la clasificación celular que se activa por fluorescencia (FACS).

Las muestras que pueden usarse en ensayos de diagnóstico de CD38 de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que puede obtenerse de un paciente que contiene cantidades detectables de proteína CD38, o fragmentos de esta, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, los niveles de CD38 en una muestra particular obtenida de un paciente saludable (por ejemplo, un paciente que no padezca una enfermedad o trastorno asociados con

niveles o actividad anormales de CD38) se medirá para establecer inicialmente un nivel inicial o estándar de CD38. Este nivel de referencia de CD38 se puede comparar después con los niveles de CD38 que se miden en muestras que se obtienen de individuos que se sospecha que tienen una enfermedad (por ejemplo, un tumor que contiene células que expresan CD38) o afección que se relaciona con CD38.

Dispositivos

La presente invención también proporciona un recipiente (por ejemplo, un vial o columna de cromatografía) o dispositivo de inyección (por ejemplo, jeringa, jeringa precargada o autoinyector) que comprende a molécula de unión a antígenos multiespecífica (por ejemplo, la formulación farmacéutica de la misma) que se expone en la presente descripción. El recipiente o dispositivo de inyección puede empaquetarse en un kit.

Un dispositivo de inyección es un dispositivo que introduce una sustancia en el cuerpo de un sujeto (por ejemplo, un humano) por vía parenteral, por ejemplo, intraocular, intravitreal, intramuscular, subcutánea o intravenosa. Por ejemplo, un dispositivo de inyección puede ser una jeringa (por ejemplo, prellenado con la formulación farmacéutica, tal como un autoinyector) que, por ejemplo, incluye un cilindro o barril para contener el fluido a inyectar (por ejemplo, que comprende la molécula de unión a antígeno o fragmento o una formulación farmacéutica de la misma), una aguja para perforar la piel, los vasos sanguíneos u otro tejido para la inyección del fluido; y un émbolo para empujar el fluido fuera del cilindro y a través del orificio de la aguja y hacia el cuerpo del sujeto.

Una composición farmacéutica proporcionada en la presente descripción se puede suministrar por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto al suministro subcutáneo, un dispositivo de suministro tipo pluma tiene fácilmente aplicaciones en el suministro de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de suministro tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de suministro tipo pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho se encuentra vacío, el cartucho vacío se puede desechar y reemplazar fácilmente con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. Luego, el dispositivo de suministro tipo pluma puede reutilizarse. En un dispositivo de suministro tipo pluma desechable, no existe un cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de suministro tipo pluma desechable viene cargado previamente con la composición farmacéutica que se mantiene en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, todo el dispositivo se desecha.

Varios dispositivos de suministro de autoinyección y de tipo pluma reutilizables tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, Ind.), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Fráncfort, Alemania), por nombrar solo algunos. Ejemplos de dispositivos de suministro tipo pluma desechables que tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), la FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y la KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, California), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.), y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park Ill.), por nombrar solo algunos.

En la presente descripción se proporcionan métodos para administrar una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente descripción que comprende introducir por ejemplo, inyectar, la molécula en el cuerpo del sujeto, por ejemplo, con un dispositivo de inyección.

Métodos de expresión

En la presente descripción se proporcionan métodos recombinantes para fabricar un molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente invención, o una cadena de inmunoglobulina de la misma, que comprende (i) introducir, en una célula huésped, uno o más polinucleótidos que codifican cadenas de inmunoglobulina ligeras y/o pesadas de tal molécula multiespecífica de unión a antígeno, por ejemplo, en donde el uno o más polinucleótidos se comprende en uno o más vectores; y/o se integra en el cromosoma de la célula huésped y/o se enlaza operativamente a un promotor; (ii) cultivar la célula huésped (por ejemplo, de mamíferos, fúngicos, de ovario de hámster chino (CHO), *Pichia* o *Pichia pastoris*) en condiciones favorables para la expresión del polinucleótido y, (iii) opcionalmente, aislando el molécula multiespecífica de unión a antígeno o cadena de inmunoglobulina de la célula huésped y/o medio en el que se cultiva la célula huésped. El producto de dicho método también forma parte de la presente descripción junto con una composición farmacéutica de este.

En algunos aspectos, la etapa (i) comprende clonar la cadena pesada A1 individual, la cadena pesada A2 y la cadena ligera universal en vectores de expresión separados. Por ejemplo, las regiones

variables de la cadena pesada (HCVR) de unión a CD38 (VH-1) se pueden clonar en un plásmido de expresión de la cadena pesada (CH1-1_CH2_CH3). Las regiones variables de la cadena pesada de unión a 4-1BB (HCVR) (VH-3) fusionadas a un dominio CH1 (CH1-3) con enlazadores de varias longitudes (enlazador) seguido de otras regiones variables de la cadena pesada de unión a 4-1BB (HCVR) (VH-2) se pueden clonar en un plásmido de expresión de la cadena pesada (CH1-2_CH2_CH3(*)) que contiene las mutaciones H435R, y Y436F, (numeración EU) (US 8,586,713). Junto con una cadena ligera universal que contiene el plásmido, los plásmidos de expresión se pueden transfectar en una célula huésped, tal como una célula CHO. Las células huésped pueden entonces producir las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno descritas en la presente descripción.

En una modalidad, un método para fabricar un la molécula multiespecífica de unión a antígeno incluye un método para purificar la molécula, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, precipitación y/o filtración. El producto de dicho método también forma parte de la presente descripción junto con una composición farmacéutica de este.

Las células huésped que comprenden una molécula multiespecífica de unión a antígeno de la presente descripción y/o un polinucleótido que codifica cadenas de inmunoglobulina de dicha molécula (por ejemplo, en un vector) también son parte de la presente invención. Las células huésped incluyen, por ejemplo, células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO) y células fúngicas tales como células de *Pichia* (por ejemplo, *P.pastoris*).

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes se proponen para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo realizar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados Centígrados, y la presión es la atmosférica o cercana a esta.

Las moléculas de unión a antígeno que se usan como controles en los Ejemplos 6 a 10 incluyen:

• Un anticuerpo biespecífico CD20xCD3 (REGN1979) (US 10.550.193) usado como señal 1 junto con un control de isotipo coincidente (REGN7540). Tanto el REGN1979 como el REGN7540 comprenden hIgG4^{P-PVA} isotipo (US 9,359,437).

• Un segundo anticuerpo biespecífico CD20xCD3 (REGN2281) usado como señal 1. El REGN2281 comprende regiones variables idénticas a las del REGN1979 con un isotipo hIgG4 que tiene la sustitución S108P (hIgG4^P)

• BCMAxCD3 (REGN5458), también usado como señal 1 (US 11.384.153).

• Comparador 1: Agonista bivalente 4-1BB (REGN4249) que comprende las regiones variables del anticuerpo “10C7” (US 7.288.638).

• Anticuerpo anti-PD-1 cemiplimab (REGN2810; LIBTAYO®) (US 9.987.500).

• el control de isotipo para el agonista bivalente 4-1BB (hIgG4P) (REGN1945); REGN1945 también se usó como el control de isotipo para el cemiplimab.

• Control de isotipo 4-1BB biespecífico x no TAA (REGN13168).

Se requieren dos señales, “señal 1” y “señal 2”, para una activación adecuada de los linfocitos T. La “señal 1” es inducida por la unión del receptor de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) unidas al péptido en células presentadoras de antígenos (APC). La “Señal 2” se proporciona al acoplar receptores coestimuladores en los linfocitos T. Uno de tales receptores coestimuladores es el receptor 4-1BB, que es una proteína de membrana de tipo I inducible y miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La expresión del receptor 4-1BB se induce en la superficie de los linfocitos T después de la activación inducida por antígeno o mitógeno. La activación de 4-1BB se produce mediante el acoplamiento con 4-1BBL, presente en las APC. Por lo tanto, la activación de la señalización 4-1BB proporciona un enfoque específico para mejorar la señalización TCR existente.

Descripciones de líneas celulares

Las características de las líneas celulares usadas en varios de los siguientes ejemplos se proporcionan más abajo:

NALM6 (ACL14036)

El clon NALM6 es una línea celular de leucemia linfoblástica aguda (ALL) aislada de un hombre de 19 años [clon NALM6 G5 (ATCC, # CRL-3273)]. Las células NALM6 se mantienen en RPMI 1640 + FBS al 10 % + P/S/G; CO al 5 % a 37 °C₂.

Tinción para confirmar la expresión

NALM6/hPD-L1 (ACL16389)

Células NALM6 que se modificaron genéticamente para expresar de manera estable el PD-L1 humano (aminoácidos M1-T290 del número de acceso NP_054862.1). Las células se mantienen en RPMI 1640 + FBS al 10 % + P/S/G + 1 ug/ml Puro; 37 °C 5 % CO₂.

5 Transfección y Transducción de Virus

Tinción para confirmar la expresión

HEK293 parental (ACL2397)

Una línea de células de riñón embrionarias humanas aislada de un feto [HEK-293 (ATCC, #CRL-1573)]. Se denomina línea celular parental HEK293. Las células HEK293 se mantienen en DMEM + FBS al 10 % + P/S/G.

10

HEK293/hCD20 (ACL14268)

Una línea celular que se produce mediante la transducción estable de células HEK293 (HZ) con CD20 humano (número de acceso Uniprot: P11836, aminoácidos M1 a P297). La línea de ingeniería se mantiene en DME + 10 % de FBS + penicilina/estreptomicina/glutamina (P/S/G) + 100 µg/ml de higromicina @ 5 % de CO₂.

15

Transfección/Producción de Virus

Transducción de la Línea Celular

Tinción para confirmar la expresión

HEK293/hCD20/hCD38 (ACL14270)

20

Una línea celular que se obtiene mediante la transducción estable de células HEK293 (HZ) con CD20 humano (número de acceso Uniprot: P11836, aminoácidos M1 a P297) y CD38 humano (número de acceso Uniprot: P28907, aminoácidos M1 a I300). La línea de ingeniería se mantiene en DME + 10 % de FBS + penicilina/estreptomicina/glutamina (P/S/G) + 500 µg/ml de G418 + 100 µg/ml de higromicina @ 5 % de CO₂.

25

Transfección/Producción de Virus

Transducción de la Línea Celular

Tinción para confirmar la expresión

HEK293/h4-1BB (ACL7888)

Una línea celular que se produce mediante la transducción estable de células HEK293 (HZ) con TNFRSF9 humano (4-1BB) (número de acceso: NM_001561, aminoácidos M1 a L255). La línea de ingeniería se mantiene en DME + 10 % de FBS + penicilina/estreptomicina/glutamina (P/S/G) + 500 µg/ml de G418 @ 5 % de CO₂.

30

Transfección/Producción de Virus

Transducción de la Línea Celular

Tinción para confirmar la expresión

HEK293/NFκB-Luc (ACL5021)

- 5 Una línea celular que se produce mediante la transfección de un gen IRES-GFP de luciferasa de luciérnaga impulsado por cinco copias del elemento de respuesta de NF-κB que se ubica aguas arriba del promotor TATA mínimo. La selección positiva de la línea celular se realizó mediante citometría de flujo y se aisló un único clon, D9.

Generación de Plásmidos.

- 10 Tinción para confirmar la expresión.

HEK293/NFκB-Luc/h4-1BB (ACL11090)

Una línea celular que se produce mediante la transducción estable de células HEK293/NFκB-Luc con TNFRSF9 humano (4-1BB) (número de acceso: NM_001561, aminoácidos M1 a L255). La línea de ingeniería se mantiene en DME + 10 % de FBS + penicilina/estreptomicina/glutamina (P/S/G) + 500 µg/ml de G418 @ 5 % de CO₂.

- 15

Transfección/Producción de Virus

Transducción de la Línea Celular

Tinción para confirmar la expresión

MOLP8 (ACL14198)

- 20 Una línea de mieloma múltiple humano establecida a partir de la sangre periférica de un hombre japonés de 52 años con mieloma múltiple en 2002. Adquirido a través de DSMZ #: ACC 569.

Tinción para confirmar la expresión

OPM2 (ACL14164)

Establecido a partir de la sangre periférica de una mujer de 56 años con mieloma múltiple en fase leucémica en 1982. Adquirido a través de DSMZ #: ACC50.

- 25

Tinción para confirmar la expresión

Ejemplo 1. Generación y cribado de anticuerpos anti-CD38 y anti-4-1BB

Los anticuerpos anti-CD38 se obtuvieron mediante la inmunización de un ratón diseñado por ingeniería genética que comprende ADN que codifica las regiones variables de la cadena ligera kappa y pesada de inmunoglobulina humana, con células que expresan CD38 o con DNA que codifica CD38. La respuesta inmunitaria de anticuerpo se monitoreó mediante un inmunoensayo específico para CD38. Cuando se logró una respuesta inmunitaria deseada, los esplenocitos se

- 30

cosecharon y se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridomas. Las líneas celulares de hibridomas se tamizaron y seleccionaron para identificar líneas celulares que producen anticuerpos específicos para CD38. Mediante el uso de esta técnica se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-CD38 (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón). Además, se generaron varios anticuerpos anti-CD38 completamente humanos a partir del aislamiento directo de linfocitos B positivos para antígeno sin fusión a células de mieloma, como se describe en el documento US 2007/0280945A1.

Igualmente, los anticuerpos anti-4-1BB se obtuvieron al inmunizar un ratón de ingeniería genética que comprende ADN que codifica regiones variables de cadena pesada e kappa de inmunoglobulina humana con células que expresan 4-1BB o con ADN que codifica 4-1BB. La respuesta inmunitaria de anticuerpos se monitoreó mediante un inmunoensayo específico de 4-1BB. Cuando se logró una respuesta inmunitaria deseada, los esplenocitos se cosecharon y se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridomas. Las líneas celulares de hibridoma se cribaron y seleccionaron para identificar líneas celulares que producen anticuerpos específicos de 4-1BB. Mediante el uso de esta técnica, varios anticuerpos quiméricos anti-4-1BB (*es decir*, se obtuvieron anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón). Además, se generaron varios anticuerpos anti-4-1BB completamente humanos a partir del aislamiento directo de linfocitos B positivos para antígenos sin fusión con células de mieloma, como se describe en el documento US 2007/0280945A1.

Los anticuerpos se caracterizan y se seleccionan para características convenientes, lo que incluye afinidad, selectividad, etcétera. Si es necesario, las regiones constantes de ratón se reemplazaron con una región constante humana deseada, por ejemplo, la región constante IgG1 o IgG4 de tipo salvaje o modificada, para generar una molécula de unión a antígeno anti-CD38 completamente humana o una molécula de unión a antígeno anti-4-1BB completamente humana. Mientras que la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de destino residen en la región variable.

Ejemplo 2. Secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera y pesada del brazo de unión anti-CD38.

La Tabla 1 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera y las CDR de los brazos de unión a antígeno anti-CD38 seleccionados de la invención. Los identificadores de secuencias de ácido nucleico correspondientes se establecen en la

Tabla 2.

Tabla 1 Identificadores de secuencias de aminoácidos anti-CD38								
Designación de Ab	HCVR (VH-1)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-1)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb26871P2	2	4	6	8	18 (3-20GL)	20	22 GAS	24
mAb26812P2	40	42	44	46	48 (1-39GL)	50	52 AAS	54

Tabla 2 Identificadores de secuencias de ácido nucleico anti-CD38								
Designación de Ab	HCVR (VH-1)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-1)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb26871P2	1	3	5	7	17 (3-20GL)	19	21 ggggcaagt	23
mAb26812P2	39	41	43	45	47 (1-39GL)	49	51 gctgcatcc	53

Los brazos de unión anti-CD38 pueden comprender un dominio variable y secuencias de CDR como se establece en la Tabla 1 y un dominio Fc humano de isotipo IgG4, IgG1, etc. Para ciertas aplicaciones o experimentos, el dominio Fc puede ser un dominio Fc de ratón. Como apreciará un experto en la técnica, un brazo de unión a antígeno que tiene un isotipo Fc particular se puede convertir en un brazo de unión a antígeno con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno con un Fc de IgG4 de ratón se puede convertir en una molécula de unión a antígeno con una IgG1 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (que incluyen los CDR) - que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1 - permanecerán iguales, y se espera que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

Ejemplo 3: Secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera y pesada del brazo de unión a 4-1BB.

La Tabla 3 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera y pesada y las CDR de los brazos de unión a 4-1BB seleccionados de los anticuerpos biespecíficos. Los identificadores de secuencias de ácido nucleico correspondientes se establecen en la Tabla 4.

Tabla 3 Identificadores de secuencias de aminoácidos anti-4-1bb								
Designación de Ab	HCVR (VH-2)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-2)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb25921P	10	12	14	16	18	20	22	24

mAb25889P2	32	34	36	38	48	50	52	54
mAb35333P2	62	64	66	68	48	50	52	54
mAb25898P2	72	74	76	78	48	50	52	54
mAb35388P2	86	88	90	92	48	50	52	54
mAb35321P2	94	96	98	100	48	50	52	54

5

Tabla 4								
Identificadores de secuencias de ácido nucleico anti-4-1bb								
Designación de Ab	HCVR (VH-2)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-2)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb25921P	9	11	13	15	17	19	21	23
mAb25889P2	31	33	35	37	47	49	51	53
mAb35333P2	61	63	65	67	47	49	51	53
mAb25898P2	71	73	75	77	47	49	51	53
mAb35388P2	85	87	89	91	47	49	51	53
mAb35321P2	93	95	97	99	47	49	51	53

10

Los brazos de unión a antígeno anti-4-1BB pueden comprender un dominio variable y secuencias de CDR como se establece en la Tabla 3 y un dominio Fc humano de isotipo IgG4, IgG1, etc. Para ciertas aplicaciones o experimentos, el dominio Fc puede ser un dominio Fc de ratón. Como apreciará un experto en la técnica, una molécula de unión a antígeno que tiene un isotipo Fc particular se puede convertir en una molécula de unión a antígeno con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno con un Fc de IgG4 de ratón se puede convertir en una molécula de unión a antígeno con una IgG1 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (que incluyen los CDR) - que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 3 - permanecerán iguales, y se espera que las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

15

20

Ejemplo 4: Generación de moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se unen a CD38 y 4-1BB

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que se unen a CD38 y 4-1BB también se denominan en la presente descripción como “anti-CD38 x anti-4-1BB 1 + 2” o “anti-CD38 x anti-4-1BB multiespecíficas”, o “anti-CD38/anti-4-1BB 1 + 2”, o “CD38x4-1BB multiespecíficas”. La porción anti-CD38 de la molécula multiespecífica anti-CD38 x anti-4-1BB es útil para dirigirse a los linfocitos Tumorales que expresan CD38, y la porción anti-4-1BB de la molécula multiespecífica es útil para activar los linfocitos T.

25

30

Diversos Fab 4-1BB (Fab3; regiones variables de la cadena pesada (HCVR) con dominio CH1 de la cadena pesada y la cadena ligera) que se unen al epítipo 1 de 4-1BB (ep1) o al epítipo 2 (ep2) se fusionaron al N-terminal de un dominio VH de 4-1BB de una molécula biespecífica similar a IgG

existente que se dirige tanto a 4-1BB como a CD38.

Los fragmentos de ADN que codifican (i) varias regiones variables (HCVR) de la cadena pesada 4-1BB (ii) el dominio CH1 de la cadena pesada seguido de enlazadores de longitudes variadas para conectar el dominio CH1 de la cadena pesada a una segunda región variable (HCVR) de la cadena pesada 4-1BB (iii) las regiones variables (HCVR) de la cadena pesada de CD38 se sintetizaron por Integrated DNA Technologies, Inc. (San Diego, California).

Los vectores de expresión de mamíferos para las cadenas pesadas individuales se crearon mediante la clonación InFusion (Takara Bio USA Inc.) siguiendo los protocolos proporcionados por Takara Bio USA Inc. Las regiones variables de la cadena pesada (HCVR) de CD38 (VH-1) se clonaron en un plásmido de expresión de cadena pesada (CH1-1_CH2_CH3). Las regiones variables de la cadena pesada de 4-1BB (HCVR) (VH-3) fusionadas a un dominio CH1 (CH1-3) con enlazadores de varias longitudes (enlazador) seguido de otras 4-1BB regiones variables de la cadena pesada (HCVR) (VH-2) se clonaron en un plásmido de expresión de la cadena pesada (CH1-2_CH2_CH3(*)) que contiene la mutación de estrella (H435R, Y436F, numeración EU).

Los MBM N-Fab de CD38 x 4-1BB x 4-1BB 1+2 N-Fab se produjeron en células CHO después de la transfección con 3 plásmidos de expresión (i) plásmido de cadena pesada de CD38 (ii) plásmido de estrella de cadena pesada de 4-1BB + 4-1BB (iii) un plásmido que contiene una cadena ligera universal. Los grupos de células CHO transfectados de forma estable se aislaron después de la selección con 400 µg/ml de higromicina durante 12 días. Los grupos de células CHO se usaron para producir los MBM de CD38 x 4-1BB x 4-1BB 1+2 N-Fab que se purificaron subsecuentemente como se describió anteriormente (Sci Rep. 11 de diciembre de 2015; 5:17943).

Un resumen de las partes componentes de los dominios de unión a antígeno de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno seleccionadas que se realizan de acuerdo con este ejemplo se establece en la Tabla 5. Los identificadores de la secuencia de ácido nucleico de las partes componentes se proporcionan en la Tabla 6. Las tablas 7 y 8 proporcionan las partes componentes, las secuencias polipeptídicas y las secuencias de ácido nucleico, respectivamente, para el control de la molécula biespecífica de unión a antígeno.

5

10

15

20

25

30

Núm. REGN.	brazo 4-1BB- ⁺ IN ⁺ (Fab2)					brazo ⁺ OUT ⁺ 4-1BB (Fab3)					LCVR					Cadena pesada y ligera de longitud completa							
	Designación Ab	VH -1	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	VH -2	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	VH -3	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	V k	CD R1	CD R2	CD R3	HC- 4-1BB	HC- CD38	LC ULC 1-39GL
7633	26812P2	40	42	44	46	25889P2	32	34	36	38	35388P2	86	88	90	92	1-39(PP) GL	48	50	52	54	56	58	60
7647	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP) GL	48	50	52	54	70	58	60
7650	26812P2	40	42	44	46	25898P2	72	74	76	78	35321P2	94	96	98	100	1-39(PP) GL	48	50	52	54	80	58	60
9682	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP) GL	48	50	52	54	82	58	60
9686	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP) GL	48	50	52	54	84	58	60

Tabla 6 Componentes de los anticuerpos formateo 1+2 seleccionados: identificadores de secuencias de ácido nucleico																											
brazo 4-1BB- ⁺ IN ⁺ (Fab2)														brazo ⁺ OUT ⁺ 4-1BB (Fab3)													
Núm. REGN.	Designación Ab	VH -1	CD	CD	CD	Designación Ab	VH -2	CD	CD	CD	Designación Ab	VH -3	CD	CD	CD	Designación Ab	V k	CD	CD	CD	CDR3	Cadena pesada y ligera de longitud completa					
			R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3			HC- 4-1BB	HC- CD38	LC ULC 1-39GL							
7633	26812P2	39	41	43	45	25889P2	31	33	35	37	35388P2	85	87	89	91	1-39(PP)GL	47	49	51	53	55	57	59				
7647	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	69	57	59				
7650	26812P2	39	41	43	45	25898P2	71	73	75	77	35321P2	93	95	97	99	1-39(PP)GL	47	49	51	53	79	57	59				
9682	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	81	57	59				
9686	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	83	57	59				

Tabla 7 Partes de componentes del anticuerpo de control formato 1 + 1: identificadores de secuencia de aminoácidos																																						
Núm. REGN.	brazo CD38										4-1BB- ⁺ IN ⁺ (Fab2)										4-1BB- ⁺ OUT ⁺ (Fab3)										LCVR				HC y LC de longitud completa			
	Designación Ab	VH	CD -1	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	VH	CD -2	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	VH- 3	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	Vk	CD R1	CD R2	CD R3	CDR 3	HC	HC	LC												
7150	26871P2	2	4	6	8	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/	25921P	10	12	14	16	3-20 GL	18	20	22	24	26	28	30													

Núm. REGN.	brazo CD38 4-1BB- ⁺ IN ⁺ (Fab2)										4-1BB- ⁺ OUT ⁺ (Fab3)										LCVR				HC y LC de longitud completa	
	Designación Ab	V H- 1	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	V H- 2	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	VH-3	CD R1	CD R2	CD R3	Designación Ab	Vk	CD R1	CD R2	CD R3	HC	LC				
7150	26871P2	1	3	5	7	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	25921P	9	11	13	15	3-20 GL	17	19	21	23	25	27	29			

Ejemplo 5: Cribado de Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno

Las construcciones que activan la vía de señalización 4-1BB se identificaron a continuación mediante cribado.

Se seleccionaron treinta y cuatro anticuerpos de unión a 4-1BB para su inclusión en la pantalla 1+2 en base a la unión celular a 4-1BB humano, la utilización de una cadena ligera común y la diversidad de las secuencias de CDR3. Para la pantalla, los dominios de 4-1BB variables se disponen en dos formatos diferentes 1+2, 4-1BB dividido o 4-1BB apilado. Ver la Figura 2B.

Para el formato dividido, se mantuvo una arquitectura bivalente estándar para 4-1BB y se logró la orientación del tumor al añadir el dominio variable y CH1 de un brazo de orientación del tumor de CD38 (26812) en el N-terminal de un lado de la molécula 4-1BB separada por un dominio espaciador G4Sx3. Estas construcciones se expresaron como biespecíficos de Knob in Hole (KiH) por lo que solo un brazo de la molécula expresada contenía el motivo de direccionamiento a CD38.

Para el formato FAB apilado, las secuencias 4-1BB de tándem se enlazaron de la misma manera que CD38 x 4-1BB descrito anteriormente, y la dirección del tumor se logró mediante la expresión como una molécula biespecífica con anti-CD38 presente en el brazo opuesto. Los treinta y cuatro dominios variables de 4-1BB junto con una secuencia de control irrelevante (anti-BetV1) se ensamblaron en todas las combinaciones posibles de FAB en tándem que generan 1.225 combinaciones. Esto incluyó treinta y cuatro moléculas donde las dos secuencias variables de 4-1BB apiladas eran idénticas.

Para la selección, las construcciones 1+2 se expresaron de forma transitoria en células CHO y los sobrenadantes biespecíficos que contenían se cosecharon 4 días después. Los sobrenadantes se añadieron a un cocultivo de células que contenía células HEK que sobreexpresan hCD38 y células Jurkat que albergan un reportero de luciferasa NFkB y que sobreexpresan 4-1BB humano. La activación y el acoplamiento de 4-1BB por las muestras de prueba se comparó con un cocultivo de las células indicadoras Jurkat con células HEK que expresan el ligando 4-1BB (100 %). Los resultados de la cribado de las FAB divididas mostraron poca o ninguna actividad en el ensayo indicador de Jurkat con la actividad más alta observada que es del 3.7 %. Por el contrario, se observó una activación robusta con el formato FAB apilado con más del veinticinco por ciento de las muestras probadas que producen actividades superiores al 30 %. Se observó actividad cuando los dominios variables 4-1BB dentro del FAB apilado eran secuencias y actividades idénticas o únicas, y se observó una actividad tan alta como el 66 %. La introducción del FAB de control irrelevante en cualquier ubicación dentro del FAB apilado dio como resultado una pérdida de actividad. Ver la Figura 2A.

Ejemplo 6: Caracterización de las moléculas de unión a antígeno multiespecífico de CD38x4-1BB que se unen mediante el uso de citometría de flujo

La unión del brazo de CD38 se probó mediante el uso de células MOLP8 que expresan endógenamente CD38. La unión del brazo 4-1BB se evaluó mediante el uso de células HEK293 modificadas para expresar h4-1BB (HEK293/h4-1BB). Las células HEK293 se usaron para determinar la unión a células no dirigidas, ya que no expresan CD38 ni 4-1BB.

La capacidad de las moléculas de unión a antígeno multiespecífico para unirse a las células se evaluó mediante el uso de citometría de flujo. Se eligieron líneas celulares para determinar la capacidad de ambos brazos anti-CD38 y anti-4-1BB para unirse a sus objetivos. En el primer experimento, los anticuerpos se incubaron con células MOLP8 (expresan endógenamente hCD38) y HEK293 (no expresan hCD38). En la segunda prueba de experimento, los anticuerpos se incubaron con las células HEK293/h4-1BB (diseñadas para expresar h4-1BB) y HEK293 (no expresan h4-1BB). La unión se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado y la medición de la fluorescencia en un citómetro de flujo.

Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno:

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y los controles probados en estos dos experimentos son como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Moléculas de unión a CD38x4-1BB y controles

Identificador MABM	Descripción
REGN7633	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN7647	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN7650	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN7150	CD38x4-1BB (1+1), (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN4249	Comparador 1
REGN7540	Control de isotipo (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN1945	Control de isotipo (hIgG4 ^P)

Experimento 1: Unión a CD38:

Las células HEK293 se elevaron con tripsina, se lavaron y se resuspendieron en tampón de tinción (FBS al 2 % en PBS). Las células MOLP8 se lavaron y resuspendieron en tampón de tinción. Las células se añadieron a los pocillos de una placa de fondo en V de 96 pocillos (3x10⁵ células/pocillo). Una titulación de dosis de anticuerpos de 1:4, 9 puntos de prueba se diluyó en tampón de tinción y se añadió a las células a una concentración final que varía de 610 fM a 10 nM (se incluyó un control

de “sin anticuerpo” como noveno punto (153 fM), etiquetado como “solo secundario”). Las células y los anticuerpos se incubaron durante 30 minutos en hielo y luego se lavaron en tampón de tinción. Las células se resuspendieron en 2 ug/ml de aloficocianina (APC) conjugada con anticuerpo secundario de cabra anti humano y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y resuspendieron en colorante de viabilidad (de acuerdo con el protocolo del fabricante) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron luego con tampón de tinción y se resuspendieron en PFA al 2 % durante 30 minutos en hielo. Después de la limpieza, las células se filtraron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la intensidad media de fluorescencia geométrica (gMFI), que se graficó subsecuentemente mediante el uso del software GraphPad Prism. EC₅₀ los valores de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación logística de 4 parámetros sobre una curva de respuesta de dosis de 9 puntos (que incluye el control solo secundario, que representa el noveno punto). Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Se observó una unión dependiente de la dosis de las moléculas de unión a antígeno multiespecífico CD38x4-1BB 1+2 (REGN7633, REGN7647 y REGN7650) y 1+1 (REGN7150) en presencia de células MOLP8, que expresan endógenamente CD38. Sin embargo, no se observó unión para el anticuerpo bivalente anti-4-1BB REGN4249. Tampoco se observó unión para los anticuerpos de control de isotipo (REGN7540 y REGN1945).

No se observó la unión del anticuerpo REGN7633 1+2 contra CD38x4-1BB o los anticuerpos de control de isotipo (REGN7540 y REGN1945) en presencia de células HEK293, que no expresan CD38. Se observó una unión débil (> 100 veces menor gMFI que en las células MOLP8) con los anticuerpos CD38x4-1BB 1+2 (REGN7647 y REGN7650) y 1+1 biespecíficos (REGN7150), así como también el anticuerpo bivalente anti-4-1BB REGN4249.

Tabla 10: Valores de unión máxima y EC₅₀ de unión para anticuerpos

	MOLP8		HEK293	
	MAX [gMFI]	EC50 [M]	MAX [gMFI]	EC50 [M]
REGN7633	8.8E+04	NC	7.1E+02	ND
REGN7647	1.2E+05	NC	1.2E+03	2.43E-10
REGN7650	1.4E+05	NC	9.5E+02	ND
REGN7150	2.1E+05	NC	1.1E+03	NC*
REGN4249	5.3E+02	ND	1.4E+03	NC*
REGN7540	4.6E+02	ND	7.4E+02	ND
REGN1945	4.5E+02	ND	7.5E+02	ND

Abreviaturas: ND: No determinado; NC: No se calculó porque los datos no se ajustaron a una

ecuación logística de 4 parámetros.

*Lo más probable es que se deba a una unión no específica

Experimento 2: Unión a 4-1BB:

Las células HEK293 y HEK293/4-1BB se elevaron con tripsina, se lavaron y resuspendieron en
5 tampón de tinción (FBS al 2 % en PBS) y se añadieron a los pocillos de una placa de fondo V de 96
pocillos (3×10^5 células/pocillo). Una titulación de dosis de anticuerpos de prueba 1:5, 9 puntos se
diluyó en tampón de tinción y se añadió a las células a una concentración final que varía de 1.3 pM
a 100 nM (se incluyó un control de “sin anticuerpo” como noveno punto (0.26 nM) etiquetado como
“solo secundario”). Las células y los anticuerpos se incubaron durante 30 minutos en hielo y luego
10 se lavaron en tampón de tinción. Las células se resuspendieron en 2 ug/ml de alofocianina (APC)
conjugada con anticuerpo secundario de cabra anti humano y se incubaron durante 30 minutos en
hielo. Las células se lavaron y resuspendieron en colorante de viabilidad (de acuerdo con el protocolo
del fabricante) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron luego con tampón
de tinción y se resuspendieron en PFA al 2 % durante 30 minutos en hielo. Después de la limpieza,
15 las células se filtraron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la intensidad media
de fluorescencia geométrica (gMFI), que se graficó subsecuentemente mediante el uso del software
GraphPad Prism. EC_{50} los valores de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación
logística de 4 parámetros sobre una curva de respuesta de dosis de 9 puntos (que incluye solo el
control secundario). Los resultados se muestran en la Tabla 11.

20 Se observó una unión dependiente de la dosis de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno
CD38x4-1BB 1+2 (REGN7633, REGN7647 y REGN7650) y 1+1 (REGN7150) en presencia de
células HEK293/h4-1BB, que se modificaron para expresar h4-1BB. También se observó la unión
del anticuerpo bivalente anti-4-1BB REGN4249. No se observó unión para los anticuerpos de control
de isotipo (REGN7540 y REGN1945).

25 No se observó la unión del anticuerpo REGN7633 1+2 contra CD38x4-1BB o los anticuerpos de
control de isotipo (REGN7540 y REGN1945) en presencia de células HEK293, que no expresan h4-
1BB. Se observó una ligera unión (más de 1000 veces menor gMFI que en las células HEK293/h4-
1BB) con las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno CD38x4-1BB 1+2 (REGN7647 y
REGN7650), la biespecífica CD38x4-1BB (REGN7150) y el anticuerpo bivalente anti-4-1BB
30 REGN4249.

Tabla 11: Valores de unión máxima y EC_{50} de unión para anticuerpos

	HEK293/4-1BB		HEK293	
	MAX [gMFI]	EC50 [M]	MAX [gMFI]	EC50 [M]
REGN7633	8.9E+05	1.47E-08	1.6E+04	ND
REGN7647	1.4E+06	6.08E-10	1.8E+04	ND
REGN7650	1.0E+06	9.97E-10	2.4E+04	NC*
REGN7150	2.4E+06	2.86E-09	2.5E+04	2.72E-09*
REGN4249	7.4E+05	8.86E-10	1.8E+04	ND
REGN7540	2.5E+04	ND	1.9E+04	ND
REGN1945	1.6E+04	ND	1.4E+04	ND

Abreviaturas: ND: No determinado; NC: No se calculó porque los datos no se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros.

*Lo más probable es que se deba a una unión no específica

Ejemplo 7: Caracterización de anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB en ensayos de activación de linfocitos T mediante el uso de HEK293/hCD20/hCD38, HEK293/hCD20, MOLP8 y linfocitos T humanos primarios.

Se requieren dos señales, “señal 1” y “señal 2”, para una activación adecuada de los linfocitos T. La “señal 1” es inducida por la unión del receptor de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) unidas al péptido en células presentadoras de antígenos (APC). Mientras que, “la señal 2” se proporciona al acoplar receptores de coestimuladores en los linfocitos T. Uno de tales receptores coestimuladores es el receptor 4-1BB, que es una proteína de membrana de tipo I inducible y miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La expresión del receptor 4-1BB se induce en la superficie de los linfocitos T después de la activación inducida por antígeno o mitógeno. La activación de 4-1BB se produce mediante el acoplamiento con 4-1BBL, presente en las APC. Por lo tanto, la activación de la señalización 4-1BB proporciona un enfoque específico para mejorar la señalización TCR existente. Los anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB (1+1 y 1+2) se diseñan para imitar el ligando natural de 4-1BB, al enlazar células diana CD38⁺ con linfocitos T positivos al receptor 4-1BB, para proporcionar la “señal 2” con el fin de mejorar la activación de los linfocitos T en presencia de una “señal 1” proporcionada por un anticuerpo biespecífico de antígeno asociado con el tumor (TAA) x CD3 o una respuesta alogénica proporcionada por la APC.

Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno:

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y los controles probados en este experimento se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Moléculas de unión a CD38x4-1BB y controles

Identificador MABM	Descripción
REGN7633	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^P -PVA)
REGN7647	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^P -PVA)
REGN7650	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^P -PVA)
REGN7150	CD38x4-1BB (1+1), (hIgG4 ^P -PVA)
REGN4249	Comparador 1
REGN7540	Control de isotipo, (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN1945	Control de isotipo, (hIgG4 ^P)
REGN5458	BCMAxCD3, (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN1979	CD20xCD3, (hIgG4 ^{P-PVA})

La capacidad de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno CD38x4-1BB para activar los linfocitos T primarios humanos al acoplar el receptor CD38 y 4-1BB para suministrar la “señal 2”, según lo determinado por la liberación de IL-2, se evaluó en presencia de una línea celular de cáncer de riñón embrionario humano diseñada para expresar hCD20 y hCD38 (HEK293/hCD20/hCD38) mediante el uso de REGN1979 (CD20xCD3) para servir como “señal 1”. Las células HEK293 que expresan solo hCD20 se incluyeron como un control para medir la actividad que puede producirse en ausencia de CD38 en las APC. Adicionalmente, se incluyó una línea celular de mieloma múltiple que expresa endógenamente hCD38, MOLP8, en la prueba de anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB. Como las células MOLP8 expresan endógenamente BCMA, se incluyó el REGN5458 (BCMAxCD3) para servir como “señal 1”. Cabe destacar que, a diferencia de las células HEK293, las células MOLP8 son capaces de proporcionar una estimulación alógena detectable de los linfocitos T, que sirve como “señal 1”, en ausencia de la estimulación de CD3 proporcionada por REGN5458.

Aislamiento de linfocitos T primarios humanos CD3⁺:

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de un paquete de leucocitos de donante sano de Precision for Medicine (Donante 555105) mediante el uso de centrifugación por gradiente de densidad. Brevemente, se añaden 15 ml de Ficoll-Paque PLUS a tubos cónicos de 50 ml y, subsecuentemente, se coloca en capas sobre ellos 30 ml de sangre diluida 1:1 con PBS que contiene FBS al 2 % de encima. Después de una centrifugación de 30 minutos a

400 x g, con el freno apagado, el recubrimiento (que contiene células mononucleares) se transfiere a un tubo nuevo, diluido 5x con PBS que contiene FBS al 2 % y se centrifuga durante 8 minutos a 300 x g. Subsecuentemente, los linfocitos T CD3⁺ se aislaron de PBMC mediante el uso de un CD3 humano EasySep™⁺ Kit de aislamiento de linfocitos T de StemCell Technologies y siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Ensayo de liberación de IL-2:

Los linfocitos T CD3⁺ enriquecidos, resuspendidos en medio de estimulación, se añadieron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una concentración de 1×10^5 linfocitos/pocillo. Se añadieron HEK293/hCD20/hCD38 o HEK293/hCD20 con detención del crecimiento a los linfocitos T CD3⁺ a una concentración final de 1×10^4 células/pocillo. Se añadieron células MOLP8 con detención del crecimiento a los linfocitos T CD3⁺ a una concentración final de 5×10^4 células/pocillo. Después de la adición de células, una constante de 0.1 nM REGN1979 o su control de isotipo coincidente (REGN7540) se añadió a los pocillos que contenían HEK293/hCD20/hCD38 o HEK293/hCD20. Se añadió una constante de 0.5 nM de REGN5458 o un control de isotipo a los pocillos que contenían células MOLP8. Subsecuentemente, el CD38x4-1BB (1+1 o 1+2), el bivalente 4-1BB (REGN4249) o los controles de isotipo (REGN7540 o REGN1945) se titularon de 3 pM a 200 nM en una dilución 1:4 y se añadieron a los pocillos. El punto final de la dilución de 10 puntos no contenía anticuerpos titulados. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C, CO al 5 %₂ y 5 µSe usó el sobrenadante total de L para medir IL-2. La cantidad de citocinas en el sobrenadante del ensayo se determinó mediante el uso de kits AlphaLisa de PerkinElmer de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las mediciones de citocinas se obtuvieron en el lector de placas multietiqueta Envision de Perkin Elmer y los valores se informaron como pg/ml. Todas las diluciones seriadas se analizaron por duplicado. Los valores de EC₅₀ de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros en una curva de respuesta a la dosis de 10 puntos mediante el uso del programa informático GraphPad Prism™. La IL-2 máxima se da como la respuesta media máxima detectada dentro del intervalo de dosis evaluado. Los resultados se proporcionan en la Tabla 13.

Resultados con las líneas celulares HEK293/hCD20 y HEK293/hCD20/hCD38

En presencia de la diana y la “señal 1”, proporcionada por REGN1979, el tratamiento con anticuerpos 4-1BB condujo a una mayor respuesta de IL-2 en comparación con los controles de isotipo emparejados (REGN7540 y REGN1945). Cabe destacar que los formatos 1+2 de CD38x4-1BB condujeron a una IL-2 máxima más alta y una mayor potencia, en comparación con 1+1 CD38x4-1BB (REGN7150) y el anticuerpo bivalente 4-1BB (REGN4249). En ausencia de CD38,

solo el bivalente 4-1BB (REGN4249) mostró un aumento dependiente de la dosis en la liberación de IL-2. En ausencia de la ‘señal 1’, ninguno de los anticuerpos conduce a una mejora dependiente de la dosis de la liberación de IL-2.

Resultados con la línea celular MOLP8

- 5 En presencia de células MOLP8 alogénicas y ausencia de REGN5458, hubo un aumento dependiente de la dosis en IL-2 observado para los anticuerpos 1+2 CD38x4-1BB REGN7647 y REGN7650 y en menor medida para el anticuerpo 1+2 CD38x4-1BB REGN7633 y el anticuerpo bivalente 4-1BB REGN4249. Los anticuerpos 1+1 CD38x4-1BB y el control de isotipo no mostraron un aumento dependiente de la dosis de la liberación de IL-2. Mientras que la “señal 1” puede proporcionarse mediante células MOLP8 alogénicas, también se evaluó la adición de REGN5458. En estas condiciones, todos los anticuerpos 4-1BB condujeron a aumentos dependientes de la dosis en la liberación de IL-2 en comparación con el control de isotipo correspondiente, con los anticuerpos 1+2 CD38x4-1BB que exhiben la mayor potencia y el aumento máximo en la IL-2.

Tabla 13: Valores máximos de liberación de IL-2 y de potencia de los anticuerpos

	HEK293/CD20/CD38 + REGN1979		HEK293/CD20 + REGN1979		HEK293/CD20/CD38 + IsoC		MOLP-8 + IsoC		MOLP-8 + REGN5458	
	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7633	1934	8.3E-11	218	2.16E-09	16	ND	177	1.31E-11	534	4.482E-10
REGN7647	2847	5.8E-12	199	NC	18	ND	331	2.21E-12	692	2.31E-11
REGN7650	2721	1.4E-11	184	NC	10	ND	288	NC	553	3.166E-11
REGN7150	1303	1E-10	182	ND	12	ND	163	ND	308	6.338E-08
REGN4249	931	1.4E-09	729	1.42E-09	15	ND	174	NC	183	5.883E-10
REGN7540	176	ND	195	ND	9	ND	170	ND	156	ND
REGN1945	173	ND	208	ND	10	ND	155	ND	164	ND

Abreviaturas: ND: No determinado; NC: No se calculó porque los datos no se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros.

- 25 Ejemplo 8: Caracterización de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de CD38x4-1BB (1+2) en ensayos de activación de linfocitos T que usan HEK293/hCD20/hCD38, HEK293/hCD20, MOLP8, NALM6 y linfocitos T primarios humanos.

Se requieren dos señales, “señal 1” y “señal 2”, para una activación adecuada de los linfocitos T. La “señal 1” es inducida por la unión del receptor de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) unidas al péptido en células presentadoras de antígenos (APC). La “Señal 2” se proporciona al acoplar receptores coestimuladores en los linfocitos

T. Uno de tales receptores coestimuladores es el receptor 4-1BB, que es una proteína de membrana de tipo I inducible y miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La expresión del receptor 4-1BB se induce en la superficie de los linfocitos T después de la activación inducida por antígeno o mitógeno. La activación de 4-1BB se produce mediante el acoplamiento con 4-1BBL, presente en las APC. Por lo tanto, la activación de la señalización 4-1BB proporciona un enfoque específico para mejorar la señalización TCR existente.

Los anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB (1+1 y 1+2) se diseñan para imitar el ligando natural de 4-1BB, al enlazar células diana CD38⁺ con linfocitos T positivos al receptor 4-1BB, para proporcionar la “señal 2” con el fin de mejorar la activación de los linfocitos T en presencia de una “señal 1” proporcionada por un anticuerpo biespecífico de antígeno asociado con el tumor (TAA) x CD3 o una respuesta alogénica proporcionada por la APC.

Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno:

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y los controles probados en este experimento se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Moléculas de unión a CD38x4-1BB y controles

Identificador MABM	Descripción, Enlazador, Isotipo
REGN7647	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)3v15 (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN9682	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)3 (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN9686	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)2 (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN7150	CD38x4-1BB (1+1), (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN13168	Control no TAAx4-1BB (1+2) (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN4249	Comparador 1
REGN5458	BCMAxCD3, (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN2281	CD20xCD3, (hIgG4 ^P)
REGN7540	Control de isotipo, (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN1945	Control de isotipo, (hIgG4 ^P)

La capacidad de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno CD38x4-1BB 1+2, que albergan diferentes enlaces entre 2 dominios Fab de unión a 4-1BB en tándem, para activar los linfocitos T primarios humanos al acoplar el receptor CD38 y 4-1BB para suministrar la “señal 2”, según lo determinado por IL-2 o IFN γ se evaluó en presencia de una línea celular de cáncer de riñón embrionario humano diseñada para expresar hCD20 y hCD38 (HEK293/hCD20/hCD38) mediante el uso de REGN2281 (CD20xCD3) para servir como “señal 1”. Las células HEK293 que expresan solo hCD20 se incluyeron como un control para medir la actividad que puede producirse en ausencia de CD38 en las APC. Adicionalmente, se incluyó una línea celular de mieloma múltiple que expresa

endógenamente hCD38, MOLP8, en la prueba de anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB (1+2). Como las células MOLP8 expresan endógenamente BCMA, se incluyó el REGN5458 (BCMAxCD3) para servir como “señal 1”. Por último, se probaron condiciones que incluyeron MOLP8 o NALM-6 (una línea celular de leucemia linfoblástica aguda que expresa endógenamente CD38) como células diana, en ausencia de un biespecífico de CD3. Cabe destacar que, a diferencia de las células HEK293, las células MOLP8 y NALM-6 son capaces de proporcionar una estimulación alogénica detectable de los linfocitos T, que sirve como “señal 1”, en ausencia de estimulación de anticuerpos CD3.

Aislamiento de linfocitos T primarios humanos CD3⁺:

- 10 Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de un paquete de leucocitos de donante sano de Precision for Medicine (Donante 555114) mediante el uso de un EasySep Human T-Cell Isolation kit de StemCell Technologies, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Subsecuentemente, los linfocitos T CD3⁺ se aislaron de PBMC mediante el uso de un CD3 humano EasySep™ Kit de aislamiento de linfocitos T de StemCell Technologies y siguiendo
- 15 las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Ensayo de activación de linfocitos T primarios:

- Los linfocitos T CD3⁺ enriquecidos, resuspendidos en medio de estimulación, se añadieron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una concentración de 1×10^5 linfocitos/pocillo. Se añadieron células diana a linfocitos T CD3⁺ a una concentración final de 1×10^4 células/pocillo para HEK293/hCD20/hCD38 o HEK293/hCD20 células o 5×10^4 células/pocillo para las células MOLP8 y NALM-6. Después de la adición de células, se añadió una constante de 0.25 nM de REGN2281 a los pocillos que contenían células HEK293/hCD20/hCD38 o HEK293/hCD20. Se añadió una constante de 0.5 nM de REGN5458 o un control de isotipo a los pocillos que contenían células MOLP8. No se añadió biespecífico de CD3 a los pocillos que contenían células diana NALM-6.
- 20 Subsecuentemente, CD38x4-1BB (1+1 o 1+2), bivalente 4-1BB (REGN4249) o controles de isotipo (REGN7540 o REGN1945) se titularon de 128fM a 50nM en una dilución 1:5 y se añadieron a los pocillos. El punto final de la dilución de 10 puntos no contenía anticuerpos titulados. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C, CO al 5 %₂ y 5 μSe usó el L total sobrenadante para medir IL-2 o IFNγ. La cantidad de citocinas en el sobrenadante del ensayo se determinó mediante el uso de
- 25 kits AlphaLisa de PerkinElmer de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las mediciones de citocinas se obtuvieron en el lector de placas multietiqueta Envision de Perkin Elmer y los valores se informaron como pg/ml. Todas las diluciones seriadas se analizaron por duplicado.
- 30

Los valores de EC₅₀ de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros en una curva de respuesta a la dosis de 10 puntos mediante el uso del programa informático GraphPad Prism™. La citocina máxima se proporciona como la respuesta máxima media detectada dentro del intervalo de dosis evaluado. Los resultados se proporcionan en las Tablas 15 y 16.

HEK293/hCD20 y HEK293/hCD20/hCD38

En presencia de la diana y la “señal 1”, proporcionada por REGN2281, el tratamiento con anticuerpos 4-1BB condujo a una mayor IL-2 e IFN γ respuesta en comparación con el isotipo IgG4 emparejado^{P-PVA}, IgG4^P, o controles de anticuerpos biespecíficos (REGN7540, REGN1945 y REGN13168, respectivamente). Cabe destacar que los formatos 1+2 de CD38x4-1BB condujeron a una mayor liberación máxima de citocinas y mayor potencia, en comparación con 1+1 de CD38x4-1BB (REGN7150) y el anticuerpo bivalente 4-1BB (REGN4249), con un nivel y potencia similar de liberación de citocinas observado independientemente de la unión entre los 2 dominios Fab de unión a 4-1BB en tándem. En ausencia del objetivo de CD38, solo el 4-1BB bivalente (REGN4249) mostró un aumento dependiente de la dosis en la liberación de citocinas.

MOLP8

En presencia de células alogénicas MOLP8 y ausencia de estimulación de anticuerpos biespecíficos de CD3, los anticuerpos 1+2 CD38x4-1BB REGN7647, REGN9682 y REGN9686, mediaron un aumento dependiente de la dosis en IL-2 e IFN γ . En comparación, el anticuerpo 1+1 CD38x4-1BB, REGN7150, y el anticuerpo bivalente 4-1BB, REGN4249, dieron lugar a aumentos menores dependientes de la dosis en IL-2 y no en IFN γ . No se observó un aumento dependiente de la dosis para los anticuerpos de control 1+2 de 4-1BB de isotipo y no dirigidos para IL-2 o IFN γ . La adición de una cantidad fija de REGN5458 (BCMAxCD3) en condiciones con células MOLP8 y linfocitos T humanos primarios dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en IL-2 e IFN γ para todos los anticuerpos 4-1BB dirigidos a CD38 así como también para REGN4249. Como se señaló anteriormente, los anticuerpos 1+2 CD38x4-1BB mostraron una mayor potencia y un aumento máximo de citocina en comparación con REGN7150 y REGN4249, con el formato de enlace entre los Fab de unión a 4-1BB que tiene poco impacto en la potencia o la liberación máxima de citocinas. El control de isotipo y los anticuerpos de control 1+2 de 1BB no TAAx4-1BB no condujeron a una liberación de citocinas dependiente de la dosis.

NALM-6

En presencia de células NALM-6 alogénicas y ausencia de estimulación de anticuerpos biespecíficos

de CD3, todos los anticuerpos 4-1BB dirigidos a CD38 (REGN7647, REGN9682, REGN9686 y REGN7150) así como también el anticuerpo bivalente 4-1BB (REGN4249), condujeron a aumentos dependientes de la dosis en IFN γ e IL-2. Los anticuerpos 1+2 CD38x4-1BB REGN7647, REGN9682 y REGN9686 mostraron una mayor potencia y una liberación máxima de citocinas en comparación con el anticuerpo 1+1 CD38x4-1BB, REGN7150 y el anticuerpo bivalente 4-1BB, REGN4249. Como se señaló anteriormente, todas las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno 1+2 CD38x4-1BB se realizaron de manera similar, independientemente del enlazador entre los Fab de unión a 4-1BB. El control de isotipo y los anticuerpos de control 1+2 de 1BB no TAAx4-1BB no condujeron a una liberación de citocinas dependiente de la dosis.

10

15

20

25

30

Tabla 15: Valores máximos de liberación de IL2 y de potencia

	HEK293/CD20/CD38 + REGN2281		HEK293/CD20 + REGN2281		MOLP-8 + REGN5458		MOLP-8 + IsoC		NALM-6	
	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7647	781	5.35E-11	61	ND	66	2.16E-10	73	NC	192	4.85E-11
REGN9682	912	6.07E-11	52	ND	79	1.33E-10	96	NC	205	7.17E-11
REGN9686	709	4.53E-11	57	ND	62	8.33E-11	90	3.61E-11	169	7.23E-11
REGN7150	593	NC	63	ND	32	NC	48	NC	122	1.08E-10
REGN13168	41	ND	57	ND	16	ND	28	ND	48	ND
REGN4249	110	NC	126	8.19E-10	19	NC	54	NC	108	NC
REGN7540	37	ND	54	ND	17	ND	21	ND	35	ND
REGN1945	48	ND	63	ND	18	ND	33	ND	41	ND

Abreviaturas: NC, no calculado porque los datos no se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros; ND, no determinado porque no se observó un aumento dependiente de la concentración.

Tabla 16: IFN γ máximo Valores de liberación y potencia

	HEK293/CD20/CD38 + REGN2281		HEK293/CD20 + REGN2281		MOLP-8 + REGN5458		MOLP-8 + IsoC		NALM-6	
	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7647	6046	6.17E-11	1908	ND	3284	7.07E-11	103	NC	655	7.03E-11
REGN9682	5271	5.26E-11	1573	ND	3406	7.25E-11	161	NC	658	4.19E-11
REGN9686	6823	8.74E-11	1449	ND	3891	1.02E-10	85	NC	651	NC
REGN7150	3951	7.80E-10	1843	ND	1297	4.38E-08	56	NC	620	NC
REGN13168	1805	ND	1638	ND	656	ND	1	ND	102	ND
REGN4249	2474	6.40E-10	2279	4.29E-09	1003	NC	37	NC	400	NC
REGN7540	2080	ND	1455	ND	602	ND	1	ND	130	ND
REGN1945	2086	ND	1664	ND	542	ND	83	NC	117	ND

Abreviaturas: NC, no calculado porque los datos no se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros; ND, no determinado porque no se sirvió un aumento dependiente de la concentración.

Ejemplo 9: Caracterización de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de CD38x4-1BB (1+2) en un ensayo reportero diseñado mediante el uso de las células HEK293/hCD20/hCD38, HEK293/hCD20, MOLP8, OPM2 y HEK293/NFkB-Luc/h4-1BB

La capacidad de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de CD38x4-1BB para activar específicamente el receptor 4-1BB en presencia de células diana que expresan CD38 se midió en un ensayo de reportero modificado. En este ensayo, las células HEK293 modificadas genéticamente expresan el gen reportero luciferasa bajo el control del factor de transcripción NF-KB (NFkB-Luc) junto con el receptor de coestimulación 4-1BB (HEK293/NFkB-Luc/h4-1BB). Las células diana que se usan en este ensayo fueron células HEK293 que se modifican para expresar CD20 solas o en combinación con CD38 o líneas celulares que expresan endógenamente CD38, específicamente OPM2 y MOLP8. La capacidad de los brazos 4-1BB para estimular la actividad 4-1BB se evalúa al combinar células reporteras con células diana y una titulación del anticuerpo CD38x4-1BB 1+2. La activación de 4-1BB da como resultado la producción de luciferasa impulsada por NFkB, que luego se mide a través de una lectura de luminiscencia. En estos ensayos, también se evaluó el impacto de diferentes tipos de enlaces entre los 2 dominios de 4-1BB de la diana tándem.

Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno:

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y los controles probados en este experimento se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Moléculas de unión a CD38x4-1BB y controles

Identificador MABM	Descripción
REGN7647	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN7650	CD38x4-1BB (1+2), (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN9682	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)3 (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN9686	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)2 (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN4249	Comparador 1
REGN7540	Control de isotipo (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN1945	Control de isotipo (hIgG4 ^P)

Un día antes del experimento, las células indicadoras HEK293 se dividieron en 5×10^5 células/ml en DMEM + FBS al 10 % + P/S/G + 500 µg/ml de medio de crecimiento G418.

El día del experimento, las células indicadoras y las células diana adherentes HEK293 se trataron con tripsina, se lavaron y se resuspendieron en medio de ensayo (DMEM + FBS al 10 % + P/S/G). Las células indicadoras HEK293/NFkB-Luc/h4-1BB se añadieron a los pocillos de placas de

microtitulación blanca de 96 pocillos a una concentración final de 5×10^3 células/pocillo, seguido de la adición de células diana, ya sea HEK293/hCD20 o HEK293/hCD20/hCD38, añadidas a una concentración final de 1×10^4 células/pocillo o células diana de MOLP8 y OPM2 añadidas a una concentración final de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo.

5 Los anticuerpos CD38x4-1BB 1+2 y de control se titularon en una dilución seriada 1:3, de 10 puntos, que varía de 3.0 pM a 20 nM de concentración final, con el último punto que no contiene anticuerpo, incluido como control. Después de la adición de los anticuerpos, las placas de microtitulación blancas de 96 pocillos se incubaron a 37 °C/5 % CO₂ durante 5 horas seguido de la adición de un volumen igual de reactivo ONE-Glo™ (Promega) para lisar las células y detectar la actividad de la
10 luciferasa. La luz emitida se capturó en Unidades de Luz Relativa (RLU) en un lector de placas de múltiples etiquetas Envision (PerkinElmer). Los valores de EC₅₀ de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación logística de 4 parámetros sobre una curva de respuesta de dosis de 10 puntos (el 10^{mo} punto no contiene anticuerpo) mediante el uso del software GraphPad Prism. Los resultados se proporcionan en la Tabla 18.

15 HEK293/hCD20 y HEK293/hCD20/hCD38

En presencia de células diana HEK293/hCD20/hCD38, los anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB 1+2 (REGN7647, REGN9682, REGN9686 y REGN7650) condujeron a un aumento similar en la actividad de la luciferasa, independientemente de la unión entre los 2 dominios Fab de unión a 4-1BB. El anticuerpo bivalente anti-4-1BB (REGN4249) también condujo a un aumento dependiente
20 de la dosis en la actividad de la luciferasa, mientras que los anticuerpos de control de isotipo no lo hicieron.

En presencia de células diana HEK293/hCD20 que carecen de CD38, no se observó ninguna respuesta con los anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB ni con los controles de isotipo. Solo el anticuerpo bivalente anti-4-1BB (REGN4249) condujo a un aumento dependiente de la dosis en la
25 actividad de la luciferasa.

Células MOLP8 y OPM2

En presencia de las células diana MOLP8 u OPM2, los anticuerpos CD38x4-1BB 1+2 (REGN7647, REGN7650, REGN9682 y REGN9686) así como el anticuerpo bivalente anti-4-1BB (REGN4249) dieron como resultado un aumento dependiente de la dosis en la actividad de la luciferasa, con las
30 diferentes variantes de enlace de longitud 1+2 de CD38x4-1BB que dan como resultado una actividad similar. Los anticuerpos de control de isotipo no dieron como resultado ninguna señal.

Tabla 18: Valores de actividad máxima de luciferasa y potencia de los anticuerpos

	HEK293/CD20/CD38		HEK293/CD20		OPM2		MOLP-8	
	MAX [RLU]	EC50 [M]	MAX [RLU]	EC50 [M]	MAX [RLU]	EC50 [M]	MAX [RLU]	EC50 [M]
REGN7647	2.4E+06	NC	1.2E+06	ND	1.9E+06	7.35E-12	2.3E+06	NC
REGN7650	2.3E+06	NC	1.5E+06	NC	2.0E+06	9.89E-11	2.4E+06	NC
REGN9682	2.4E+06	NC	1.0E+06	ND	2.1E+06	2.19E-11	2.2E+06	NC
REGN9686	2.4E+06	NC	1.1E+06	NC	2.1E+06	1.80E-11	2.2E+06	NC
REGN4249	2.8E+06	4.28E-11	3.3E+06	6.82E-11	2.9E+06	5.25E-11	2.7E+06	4.59E-11
REGN7540	9.9E+05	ND	1.2E+06	ND	8.5E+05	ND	7.9E+05	ND
REGN1945	1.0E+06	ND	9.5E+05	ND	7.5E+05	ND	7.8E+05	ND

Abreviaturas: ND: No determinado, porque no se observó un aumento dependiente de la concentración; NC: No se calculó porque los datos no se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros.

Ejemplo 10: Caracterización de anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB 1+2 en el ensayo de combinación de Cemiplimab alogénico de linfocitos T mediante el uso de NALM-6, NALM-6/PDL1 y linfocitos T primarios humanos

Se requieren dos señales, “señal 1” y “señal 2”, para una activación adecuada de los linfocitos T. La “señal 1” es inducida por la unión del receptor de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) unidas al péptido en células presentadoras de antígenos (APC). La “Señal 2” se proporciona al acoplar receptores coestimuladores en los linfocitos T. Uno de tales receptores coestimuladores es el receptor 4-1BB, que es una proteína de membrana de tipo I inducible y miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). La expresión del receptor 4-1BB se induce en la superficie de los linfocitos T después de la activación inducida por antígeno o mitógeno. La activación de 4-1BB se produce mediante el acoplamiento con 4-1BBL, presente en las APC. Por lo tanto, la activación de la señalización 4-1BB proporciona un enfoque específico para mejorar la señalización TCR existente.

Los anticuerpos biespecíficos de CD38x4-1BB (1+2) se diseñan para imitar el ligando natural de 4-1BB, al enlazar CD38⁺ células diana con linfocitos T positivos al receptor 4-1BB, para proporcionar la “señal 2” con el fin de mejorar la activación de los linfocitos T en presencia de una “señal 1” que se proporciona mediante un anticuerpo biespecífico antígeno asociado con el tumor (TAA) x CD3 o una respuesta alogénica que se proporciona por el APC. Sin embargo, la activación de los linfocitos T puede inhibirse por la ligadura del receptor de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) en los linfocitos T con su ligando PD-L1 en las APC. La PD-1 ligada conduce al reclutamiento de fosfatasa a CD28 y al complejo TCR (Zou y otros. Moléculas inhibitorias de la familia B7 en el

microambiente tumoral. Nature Reviews Immunology 2008, 8:467-477; Francisco y otros. 2010, Hui y otros. El receptor de coestimulación de linfocitos T CD28 es un objetivo principal para la inhibición mediada por PD-1. Science. 2017, 355(6332):1428-33), que a su vez contrarrestan la señalización del TCR y la estimulación de 4-1BB. Por tanto, el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 con un antagonista de PD-1, cemiplimab, en combinación con anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB puede potenciar la función de los linfocitos T.

Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno:

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y los controles probados en este experimento se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Moléculas de unión a CD38x4-1BB y controles

Identificador MABM	Descripción
REGN7633	CD38x4-1BB 1+2, hIgG4 ^{P-PVA}
REGN7647	CD38x4-1BB 1+2, hIgG4 ^{P-PVA}
REGN7650	CD38x4-1BB 1+2, hIgG4 ^{P-PVA}
REGN4249	Comparador 1
REGN2810	Anticuerpo PD-1 (Cemiplimab), hIgG4 ^P
REGN7540	Control de isotipo, hIgG4 ^{P-PVA}
REGN1945	Control de isotipo, hIgG4 ^P

La capacidad de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno CD38x4-1BB 1+2 para activar los linfocitos T primarios humanos al acoplar CD38 y 4-1BB para suministrar “la señal 2”, según lo determinado por IL-2 e IFN γ liberación, se evaluó en presencia de un CD38⁺ línea celular de cáncer de leucemia linfoblástica aguda humana diseñada para expresar PD-L1 (NALM6/hPD-L1). Las células NALM6 proporcionan una respuesta de TCR alogénica suficiente para servir como “señal 1”. La adición de una concentración fija del anticuerpo antagonista de PD-1, cemiplimab, se evaluó en presencia de una titulación de CD38x4-1BB 1+2 o anticuerpos de control.

Aislamiento de linfocitos T primarios humanos CD3⁺:

Las células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) se aislaron de un paquete de leucocitos de un donante sano de Precision for Medicine (Donante 555192) mediante el uso del kit de aislamiento de PBMC humanas directo EasySepTM, de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes y se congelaron. Los linfocitos T CD3⁺ se aislaron mediante la descongelación de viales de PBMC congeladas. Las PBMC de donantes se enriquecieron para los linfocitos T CD3⁺ mediante el uso de un kit de aislamiento de linfocitos T humanos CD3⁺ EasySepTM de StemCell Technologies y de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Ensayo de liberación de IL-2 e IFN γ :

Los linfocitos T CD3⁺ enriquecidos, resuspendidos en medio de estimulación, se añadieron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una concentración de 1×10^5 linfocitos/pocillo. Las células NALM6 o las células NALM-6 modificadas para expresar hPD-L1, se añadieron a los linfocitos T CD3⁺ a una concentración final de 5×10^4 células/pocillo. Subsecuentemente, REGN7633, REGN7647, REGN7650, REGN4249 y REGN7540, se titularon de 0.76 pM a 50 nM en una dilución 1:4 y se añadieron a los pocillos. El punto final de la dilución de 10 puntos no contenía anticuerpos titulados. Después de la adición del anticuerpo titulado, se añadió a los pocillos un constante de 20 nM de cemiplimab o su control de isotipo emparejado (REGN1945). Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C, CO al 5 %₂ y 5 μ L del sobrenadante se usó para medir IL-2 e IFN γ . La cantidad de citocinas en el sobrenadante del ensayo se determinó mediante el uso de kits AlphaLISA de PerkinElmer de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las mediciones de citocinas se obtuvieron en el lector de placas multietiqueta Envision de Perkin Elmer y los valores se informaron como pg/ml. Todas las diluciones seriadas se analizaron por triplicado.

Resultados

Los valores de EC₅₀ de los anticuerpos se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros en una curva de respuesta a la dosis de 10 puntos mediante el uso del programa informático GraphPad Prism[™]. La citocina máxima se proporciona como la respuesta máxima media detectada dentro del intervalo de dosis evaluado. Los resultados se proporcionan en las Tablas 20 y 21.

En presencia de células NALM6 alogénicas o células NALM6 modificadas para expresar PD-L1, el tratamiento con anticuerpo CD38x4-1BB 1+2 (REGN7633, REGN7647 y REGN7650), en comparación con el control de isotipo emparejado (REGN7540), condujo a aumentos dependientes de la dosis en la liberación de IL-2 e IFN γ . La liberación máxima de IL-2 e IFN γ fue menor en condiciones con células NALM6/PD-L1, en comparación con NALM-6 (que no expresa PD-L1). En presencia de células NALM6 que expresan PD-L1, el cemiplimab aumentó la liberación máxima de citocinas en comparación con el control de isotipo emparejado para cemiplimab, REGN1945. Cabe destacar que los formatos 1+2 del anticuerpo CD38x4-1BB condujeron a una mayor liberación máxima de citocinas y una mayor potencia, en comparación con el anticuerpo bivalente 4-1BB (REGN4249).

Tabla 20: Valores máximos de liberación de IL-2 y potencia

	NALM6 + IgG4P		NALM6 + Cemiplimab		NALM6/PD-L1 + IgG4P		NALM6/PD-L1 + Cemiplimab	
IL-2	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7633	853	6.22E-10	756	4.54E-10	205	4.13E-10	470	5.20E-10
REGN7647	1117	5.79E-11	1043	4.77E-11	433	1.17E-10	683	9.11E-11
REGN7650	1242	1.79E-10	1359	1.55E-10	326	2.28E-10	665	2.83E-10
REGN7540	125	ND	135	ND	32	ND	102	ND
REGN4249	413	6.03E-10	307	4.132E-10	143	3.96E-10	259	2.43E-10

Abreviaturas: ND: No determinado; NC: No se calculó porque los datos no se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros.

Tabla 21: Valores de liberación de IFN γ y de potencia máximos

	NALM-6 + IgG4P		NALM-6 + Cemiplimab		NALM-6/PD-L1 + IgG4P		NALM-6/PD-L1 + Cemiplimab	
IFN γ	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]	MAX [pg/ml]	EC50 [M]
REGN7633	519	6.37E-10	1095	NC	1	ND	272	1.28E-09
REGN7647	707	8.15E-11	1067	NC	67	NC	557	NC
REGN7650	1008	NC	962	1.56E-10	15	NC	244	NC
REGN7540	86	ND	333	ND	1	ND	14	ND
REGN4249	616	NC	919	NC	7	NC	324	NC

Abreviaturas: ND: No determinado; NC: No se calculó porque los datos no se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros.

Ejemplo 11: *In Vivo* Eficacia antitumoral de los anticuerpos biespecíficos CD38x4-1BB en combinación con un anticuerpo biespecífico BCMAxCD3.

Las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno y los controles probados en este experimento se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Moléculas de unión a CD38x4-1BB y controles

Identificador MABM	Descripción
REGN5458	BCMAxCD3 bsAB
REGN13168	Control no TAAx4-1BB (1+2) (hIgG4 ^{P-PVA})
REGN9686	CD38x4-1BB (1+2), (G4S)2 (hIgG4 ^{P-PVA})

Para determinar el *in vivo* Para evaluar la eficacia antitumoral de los anticuerpos biespecíficos (bsAb) en el formato CD38x4-1BB 1+2 en combinación con un bsAb BCMAxCD3, se realizó un estudio de tumor xenogénico. El día -11, NOD.Cg-Prkdc inmunodeficiente^{scid}Il2rg^{tm1Wjl} Los ratones /SzJ (NSG) se inyectaron por vía intraperitoneal con 4x10⁶ células mononucleares de sangre periférica

humana (PBMC) de un donante normal y sano. El día 0, los ratones se administraron por vía intravenosa con 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple humano MOLP-8 BCMA⁺CD38⁺ que se diseñaron por ingeniería genética para expresar además luciferasa de luciérnaga (células MOLP-8-luciferasa). Los ratones (n=4-5 por grupo) se administraron inmediatamente un Ab biespecífico de control de unión a CD3 o un anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 (REGN5458; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20200024356) a 0.4 mg/kg, en combinación con un Ab biespecífico de control de unión a 4-1BB (formato 1+2) o un anticuerpo biespecífico CD38x4-1BB (formato 1+2; REGN9686) a 4 mg/kg. Los ratones se administraron con estos anticuerpos dos veces más los días 7 y 14, para un total de tres dosis. El crecimiento del tumor se evaluó durante 53 días midiendo la bioluminiscencia del tumor (BLI) en animales anestesiados. Como control positivo, a un grupo de ratones (n=5) se les administró solo células MOLP-8-luciferasa y PBMC, pero no anticuerpos (grupo tratado con PBS). Para medir los niveles de fondo de BLI, un grupo de ratones (n=5) no se trataron y no recibieron tumores, PBMC, o anticuerpo (grupo Sin tumor).

Estos estudios demuestran que, aunque la monoterapia con anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 demuestra solo una eficacia antitumoral modesta y la monoterapia con anticuerpo biespecífico CD38x4-1BB 1+2 demuestra poca/nada actividad antitumoral, el tratamiento combinado con el anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 más el anticuerpo biespecífico CD38x4-1BB 1+2 da como resultado una eficacia antitumoral combinada más potente que es superior a cualquier terapia por sí sola.

Implantación y medición de tumores xenogénicos

El día -11, NOD.Cg-Prkdc inmunodeficiente^{scid}Il2rg^{tm1Wjl} Los ratones /SzJ (NSG) se inyectaron por vía intraperitoneal con 4×10^6 células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de un donante normal y sano. El día 0, los ratones se administraron por vía intravenosa con 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple humano MOLP-8 BCMA⁺CD38⁺ que se diseñaron por ingeniería genética para expresar además luciferasa de luciérnaga (células MOLP-8-luciferasa). Los ratones (n=4-5 por grupo) se administraron inmediatamente un anticuerpo biespecífico de control de unión a CD3 o un anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 (REGN5458) a 0.4 mg/kg, en combinación con un anticuerpo biespecífico de control de unión a 4-1BB (formato 1+2) o un anticuerpo biespecífico CD38x4-1BB (formato 1+2; REGN9686) a 4 mg/kg. Los ratones se administraron con estos Ab dos veces más los días 7 y 14, para un total de tres dosis. El crecimiento del tumor se evaluó durante 53 días midiendo la bioluminiscencia del tumor (BLI) en animales anestesiados. Como control positivo, a un grupo de ratones (n=5) se les administró solo células MOLP-8-luciferasa y PBMC, pero no

anticuerpos (grupo tratado con PBS). Para medir los niveles de fondo de BLI, un grupo de ratones (n=5) no se trataron y no recibieron tumores, PBMC, o anticuerpo (grupo Sin tumor).

Medición del crecimiento tumoral xenogénico

Se usó obtención de imágenes por BLI para medir la carga tumoral. A los ratones se les inyectó por vía IP 150 mg/kg del sustrato de luciferasa D-luciferina suspendido en PBS. Cinco minutos después de esta inyección, se realizó la obtención de imágenes por BLI de los ratones bajo anestesia con isoflurano mediante el uso del sistema Xenogen IVIS. La adquisición de imágenes se llevó a cabo con el campo de visión en D, la altura del sujeto de 1.5 cm y el nivel de agrupamiento medio con tiempo de exposición automático determinado por el programa informático Living Image. Las señales de BLI se extrajeron mediante el uso del programa informático Living Image: las regiones de interés se dibujaron alrededor de cada masa tumoral y las intensidades de fotones se registraron como flujo total (fotones/segundo – p/s).

Resultados:

Las Tablas 23-32 proporcionan los resultados de las combinaciones de tratamiento sobre la carga tumoral y la supervivencia del sujeto a los 6, 10, 13, 17, 20, 24, 27, 31, 34, y 38 días después de la administración de células tumorales de mieloma múltiple humano. La Figura 3 es una representación gráfica de los datos mostrados en las tablas durante los 38 días. La Figura 4A ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con PBS con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; la Figura 4B ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; la Figura 4C ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; la Figura 4D ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales; la Figura 4E ilustra la carga tumoral a lo largo del tiempo en los ratones tratados con BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg) con relación a los ratones que no recibieron células tumorales.

Monoterapia con BCMAxCD3: El bsAb BCMAxCD3 (REGN5458) más el bsAb de control de unión a 4-1BB proporcionó cierta eficacia antitumoral, con lecturas medias de BLI reducidas en comparación con los ratones que recibieron el bsAb de control de unión a CD3 más el bsAb de control de unión a 4-1BB $p<0.0001$ el día 24 y $p=0.0015$ el día 26 mediante análisis ANOVA

bidireccional.

Monoterapia con CD38x4-1BB: El tratamiento con el bsAb de control de unión a CD3 más el bsAb de CD38x4-1BB 1+2 (REGN9686) no redujo significativamente la lectura media de BLI en comparación con los ratones que recibieron el bsAb de control de unión a CD3 más el bsAb de control de unión a 4-1BB.

BCMAxCD3 + CD38x4-1BB 1+2: La combinación de BCMAxCD3 bsAb (REGN5458) más CD38x4-1BB 1+2 bsAb (REGN9686) dio como resultado lecturas medias de BLI que fueron más bajas que los ratones que recibieron BCMAxCD3 bsAb más bsAb de control de unión a 4-1BB ($p < 0.0001$ el día 38 mediante análisis ANOVA bidireccional).

Por tanto, estos estudios demuestran que, aunque la monoterapia con bsAb BCMAxCD3 demuestra solo una eficacia antitumoral modesta y la monoterapia con bsAb CD38x4-1BB 1+2 demuestra poca o ninguna actividad antitumoral, el tratamiento combinado con bsAb BCMAxCD3 más bsAb CD38x4-1BB 1+2 da como resultado una eficacia antitumoral combinada más potente que es superior a cualquier terapia por sí sola.

Tabla 23: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 6

Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 6	SEM de flujo total el día 6	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 6
Vehículo PBS	8.67E+05	4.66E+04	5
bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	8.80E+05	4.38E+04	5
bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	7.81E+05	5.36E+04	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	8.40E+05	4.47E+04	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	7.82E+05	2.34E+04	5
Sin tumor (BLI de fondo)	9.54E+05	3.42E+04	5

Tabla 24: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 10

Anticuerpo Tratamiento	Carga Tumoral: Flujo Total Medio (p/s) el Día 10	SEM de flujo total el día 10	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 10
Vehículo PBS	1.01E+06	4.01E+04	5
bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) +	8.84E+05	2.98E+04	5

5	bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)			
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	7.69E+05	3.04E+04	5
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	8.96E+05	4.41E+04	4
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	8.49E+05	4.95E+04	5
	Sin tumor (BLI de fondo)	9.41E+05	3.62E+04	5

Tabla 25: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 13

10	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 13	SEM de flujo total el día 13	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 13
	Vehículo PBS	1.24E+06	1.07E+05	5
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	1.01E+06	1.60E+05	5
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	7.67E+05	2.92E+04	5
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	7.20E+05	3.41E+04	4
15	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	6.37E+05	2.39E+04	5
	Sin tumor (BLI de fondo)	7.88E+05	3.52E+04	5

Tabla 26: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 17

20	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 17	SEM de flujo total el día 17	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 17
	Vehículo PBS	6.16E+06	1.51E+06	5
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	3.81E+06	1.07E+06	5
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	1.84E+06	3.30E+05	5
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	6.74E+05	7.70E+04	4
25	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	7.69E+05	5.96E+04	5
	Sin tumor (BLI de fondo)	7.63E+05	4.76E+04	5

Tabla 27: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 20

30	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 20	SEM de flujo total el día 20	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 20
	Vehículo PBS	1.10E+07	1.70E+06	5
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg)	1.06E+07	5.11E+06	5

	mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)			
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	3.81E+06	5.67E+05	5
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	7.88E+05	3.78E+04	4
5	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	7.36E+05	2.41E+04	5
	Sin tumor (BLI de fondo)	8.52E+05	1.57E+04	5

Tabla 28: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 24

	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 24	SEM de flujo total el día 24	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 24
10	Vehículo PBS	2.44E+07	4.43E+06	5
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	3.60E+07	1.18E+07	5
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	1.82E+07	6.39E+06	5
15	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	1.14E+06	4.30E+05	4
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	7.15E+05	1.19E+04	5
	Sin tumor (BLI de fondo)	7.91E+05	2.05E+04	5

Tabla 29: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 27

	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 27	SEM de flujo total el día 27	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 27
20	Vehículo PBS	4.21E+07	7.71E+06	4
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	2.67E+07	7.65E+06	2
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	6.11E+07	3.02E+07	5
25	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	1.47E+06	5.55E+05	4
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	6.92E+05	5.29E+04	5
	Sin tumor (BLI de fondo)	8.85E+05	6.27E+04	5

Tabla 30: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 31

	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 31	SEM de flujo total el día 31	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 31
30	Vehículo PBS	No hay ratones	N/C	0

	vivos		
bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	7.95E+07	0.00E+00	1
bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	1.15E+08	5.50E+07	5
BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	3.91E+06	2.35E+06	4
BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	8.08E+05	8.44E+04	5
Sin tumor (BLI de fondo)	8.65E+05	3.41E+04	5

Tabla 31: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 34

10	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 34	SEM de flujo total el día 34	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 34
	Vehículo PBS	No hay ratones vivos	N/C	0
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	No hay ratones vivos	N/C	0
15	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	2.24E+08	1.60E+08	2
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	3.25E+06	1.75E+06	4
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	9.27E+05	1.26E+05	5
	Sin tumor (BLI de fondo)	9.75E+05	2.55E+04	5

Tabla 32: Eficacia antitumoral a través del tratamiento de combinación con BCMAxCD3 bsAb más CD38x4-1BB 1+2 bsAb – Día 38

	Anticuerpo Tratamiento	Carga tumoral: flujo total medio (p/s) el día 38	SEM de flujo total el día 38	Cantidad de ratones que aún están vivos el día 38
	Vehículo PBS	No hay ratones vivos	N/C	0
25	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	No hay ratones vivos	N/C	0
	bsAb de control de unión a CD3 (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	No hay ratones vivos	N/C	0
	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + bsAb de control de unión a 4-1BB (4 mg/kg)	2.12E+07	1.11E+07	4
30	BCMAxCD3 bsAb (0.4 mg/kg) + CD38x4-1BB (4 mg/kg)	1.79E+06	1.13E+06	4
	Sin tumor (BLI de fondo)	8.22E+05	7.30E+04	5

Ejemplo 12: Cinética de unión de Biacore de moléculas de unión a antígeno anti-CD38x4-1BB.

La cinética de unión de los anticuerpos anti-CD38x4-1BB se determinó mediante la cinética de unión de la captura de anticuerpos Biacore del 1+2 de los anticuerpos anti-CD38x4-1BB que se unen a los reactivos 4-1BB monoméricos y diméricos humanos y la cinética de unión de la captura de antígenos Biacore de los anticuerpos 1+2 anti-CD38x4-1BB que se unen al reactivo 4-1BB dimérico humano. Ambos experimentos se realizaron a 25 °C.

Método de Formato de Captura de Anticuerpos:

Constantes de disociación de equilibrio (K_D valores) para 4-1BB humano expresado con una etiqueta C-terminal myc-myc-hexahistidina (h4-1BB.mmH, REGN3584) o 4-1BB humano expresado con una etiqueta C-terminal Fc murina (h4-1BB.mFc, REGN3585) que se une a anticuerpos anti-CD38x4-1BB 1+2 purificados se determinaron mediante el uso de un biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real mediante el uso de un instrumento Biacore 8k. La superficie del sensor Biacore CM5 se derivatizó por acoplamiento de amina con un anticuerpo anti-Fc humano monoclonal de ratón (REGN2567). Todos los estudios de unión de Biacore se realizaron en un tampón compuesto de HEPES 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0.05 % v/v (tampón de corrida HBS-EP). Se inyectaron diferentes concentraciones de h4-1BB.mmH (REGN3584) preparadas en tampón de corrida HBS-EP (que varía de 100 a 6.25 nM en diluciones en serie de 4 veces) o h4-1BB.mFc (REGN3585) preparadas en tampón de corrida HBS-EP (que varía de 100 a 1,56 nM en diluciones en serie de 4 veces) sobre los anticuerpos anti-CD38x4-1BB 1+2 capturados a un régimen de flujo de 30 µl/minuto. La asociación del reactivo de anticuerpo se monitoreó durante 5 minutos, mientras que la disociación en el tampón de ejecución HBS-EP se monitoreó durante 10 minutos. Al final de cada ciclo, la superficie de captura del anticuerpo anti-CD38x4-1BB 1+2 se regeneró mediante el uso de una inyección de 10 segundos de ácido fosfórico 20 mM. Todos los experimentos de cinética de unión se realizaron a 25 °C. Los resultados se presentan en las Tablas 33 y 34.

Procedimiento del Formato de Captura de Antígenos:

Constantes de disociación de equilibrio (K_D valores) para 4-1BB humano expresado con una etiqueta Fc murina C-terminal (h4-1BB.mFc, REGN3585) que se une a los anticuerpos anti-CD38x4-1BB 1+2 purificados se determinaron mediante el uso de un biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real mediante el uso de un instrumento Biacore 4000. La superficie del sensor Biacore CM5 se derivatizó por acoplamiento de amina con un anticuerpo anti-ratón Fc policlonal de conejo (GE, # BR-1008-38). Todos los estudios de unión de Biacore se realizaron en un tampón

compuesto de HEPES 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0.05 % v/v (tampón de corrida HBS-EP). Se inyectaron diferentes concentraciones de los constructos de CD38x4-1BB 1+2 preparados en tampón de corrida HBS-EP (que varían de 100 a 6.25 nM en diluciones en serie de 4 veces) sobre la superficie capturada h4-1BB.mFc (REGN3585) a un régimen de flujo de 30 µl/minuto. La asociación del reactivo de anticuerpo se monitoreó durante 5 minutos, mientras que la disociación en el tampón de ejecución HBS-EP se monitoreó durante 10 minutos. Al final de cada ciclo, la superficie de captura de h4-1BB.mFc se regeneró mediante el uso de una inyección de 40 segundos de glicina 10 mM, pH 1.5. Todos los experimentos de cinética de unión se realizaron a 25 °C. Los resultados se presentan en la Tabla 35.

10 Análisis de Datos de Ambos Formatos:

Asociación cinética (k_a) y disociación (k_d) las constantes de la tasa se determinaron al ajustar los sensorgramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 mediante el uso del software de ajuste de curva Cytiva Insight. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ y } t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Tabla 33: Parámetros de unión cinética y de equilibrio de 4-1BB humano monomérico a los anticuerpos 1+2 anti-CD38x4-1BB capturados en la superficie a 25 °C

REGN # / Ab PID #	Captura de Ab (RU)	Unión h4- 1BB.mmH 100nM (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7633	394.6 ± 1.4	24.9*	IC**	IC**	IC**	IC**
REGN7647	506.8 ± 3.1	86.1	3.24E+05	5.33E-03	1.65E-08	2.2
REGN7650	458.9 ± .4	41.9	2.62E+05	5.35E-03	2.04E-08	2.2
REGN9682	607.1 ± 1.1	106.8	3.58E+05	4.94E-03	1.38E-08	2.3
REGN9686	606.9 ± .5	101.3	3.19E+05	4.74E-03	1.48E-08	2.4

*Se observó una unión dependiente de la dosis de h4-1bb.mmH

**IC: La unión observada no se ajustó al modelo de simulación de unión y no se determinaron parámetros cinéticos de unión en las condiciones experimentales actuales.

Tabla 34: Parámetros de unión cinética y de equilibrio de 4-1BB dimérico humano a los anticuerpos 1+2 anti-CD38x4-1BB capturados en la superficie a 25 °C

REGN # / Ab PID #	Captura de Ab (RU)	100 nM de unión h4-1BB.mFc (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN7633	395.4 ± 0.3	82.1	2.74E+05	2.51E-04	9.17E-10	46.0
REGN7647	505.3 ± 1.4	223.6	1.95E+05	2.31E-04	1.18E-09	50.0
REGN7650	458.3 ± 0.6	152.0	1.02E+05	1.22E-04	1.20E-09	94.9
REGN9682	603.2 ± 1.7	283.3	2.06E+05	1.77E-04	8.60E-10	65.3
REGN9686	600.2 ± 2.4	267.4	1.71E+05	2.05E-04	1.20E-09	56.3

Tabla 35: Parámetros de unión cinética y de equilibrio de los anticuerpos anti-CD38x4-1BB 1+2 a 4-1BB humano dimérico capturado en la superficie a 25 °C

REGN # / Ab PID #	Captura de Ag ⁺	Unión de Ab 100 nM (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN7633	132.0 ± 0.4	285.3	1.86E+05	2.37E-03	1.27E-08	4.9
REGN7647	142.2 ± 0.5	205.8	6.26E+05	3.51E-04	5.60E-10	32.9
REGN7650	127.5 ± 0.8	265.7	2.12E+05	1.69E-04	7.97E-10	68.4
REGN9682	116.8 ± 0.4	233.7	4.30E+05	3.08E-04	7.16E-10	37.6
REGN9686	127.4 ± 0.8	232.3	4.70E+05	3.37E-04	7.17E-10	34.3

La presente invención no se limita en su alcance por las modalidades específicas descritas en la presente descripción. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las que se describen en la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Tales modificaciones pretenden caer dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.