

ANTICUERPOS ANTI-B7H3 Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

[001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud PCT N.º PCT/CN2023/082099, presentada el 17 de marzo de 2023, titulada “Anticuerpos anti-B7H3 y Métodos de Uso”, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

[002] La presente divulgación se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana.

ANTECEDENTES

[003] B7H3 o B7-H3 es una proteína transmembrana de tipo I identificada en 2001 a partir de una genoteca de ADNc de células dendríticas (DC) (Chapoval, Ni et al. 2001). También se le llama CD276, B7RP-2, etc. B7H3, como parte de la familia inmunorreguladora B7, incluye dos isoformas, 4Ig-B7H3 y 2Ig-B7H3, en humanos, y 4Ig-B7H3 es la principal isoforma expresada en células malignas (Steinberger, Majdic y otros 2004). El dominio extracelular de B7H3 de ratón está compuesto por un único par de dominios similares a la variable de inmunoglobulina (IgV) y similares a la constante de inmunoglobulina (IgC), mientras que B7H3 humana contiene un solo par o dos pares idénticos debido a la duplicación de exones (Sun, Richards et al. 2002, Steinberger, Majdic et al. 2004). El dominio intracelular de B7H3 es corto y no tiene ningún motivo de señalización conocido (Picarda, Ohaegbulam et al. 2016). Además de la forma transmembrana, B7H3 puede existir en una forma soluble, que se escinde de la membrana B7H3 mediante proteinasa o se produce mediante empalme alternativo (Zhang, Hou et al. 2008).

[004] Al pertenecer a la familia de proteínas B7, B7H3 comparte un 20-27% de identidad de aminoácidos con otros ligandos de la familia B7, pero el o los receptores aún no se han dilucidado (Chapoval, Ni et al. 2001). Hasta la fecha, los mecanismos moleculares por los cuales B7H3 participa en la evasión inmune siguen siendo difíciles de alcanzar y la función de B7H3 en la inmunidad adaptativa mediada por células T sigue siendo controvertida. Aunque originalmente se identificó como una molécula co-estimuladora de células T (Chapoval, Ni et al. 2001, Zhang, Chen et al. 2004), estudios posteriores sugieren que desempeña principalmente un papel inmunosupresor (Suh, Gajewska et al. 2003, Prasad, Nguyen et al. 2004, Fukushima, Sumi et al. 2007, Veenstra, Flynn et al. 2015). Mientras tanto, la estructura cristalina del B7H3 de ratón revela que el bucle FG es importante para la inhibición de la proliferación de células T mediada por mB7H3 (Vigdorovich, Ramagopal et al. 2013). En particular, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con alta expresión de B7H3 se

asoció con un menor número de linfocitos infiltrantes de tumores y fue más refractario a la terapia anti-PD1, lo que sugiere un papel de B7H3 en la evasión inmune. Por lo tanto, la terapia dirigida a B7H3 combinada con la terapia con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 es un enfoque prometedor para los NSCLC que expresan B7H3 (Altan, Pelekanou et al. 2017).

5 **[005]** Además de la regulación inmune, B7H3 también tiene una función protumoral intrínseca. El análisis TCGA reveló que la expresión de B7H3 se correlaciona con la vía EGFR/PI3K/AKT, la vía MAPK y el proceso EMT en todos los tipos de cáncer, y la expresión aberrante de B7H3 promueve la metástasis tumoral, la angiogénesis, el metabolismo glucolítico y la resistencia a los fármacos (Tekle, Nygren et al. 2012, Liu, Zhang et al. 2015, Lee, Martin-Orozco et al. 2017, Flem-Karlsen, Fodstad et al. 2018, Liu, Zhang et al. 2019, Lai, Sun et al. 2020). En consecuencia, la sobreexpresión de B7H3 se correlaciona con un mal pronóstico y malos resultados clínicos en muchos tipos de cáncer (Crispen, Sheinin et al. 2008, Bachawal, Jensen et al. 2015, Fan, Zhu et al. 2016, Song, Shi et al. 2016, Wu, Zhao et al. 2016, Benzon, Zhao et al. 2017).

15 **[006]** Numerosos estudios han informado que B7H3 está altamente sobreexpresada en una amplia gama de tumores sólidos y vasculatura tumoral, pero tiene una expresión limitada a un nivel bajo en tejidos normales (Loo, Alderson et al. 2012, Seaman, Zhu et al. 2017, Du, Hirabayashi et al. 2019, Yamato, Hasegawa et al. 2022), lo que la convierte en un objetivo atractivo para la terapia contra el cáncer. La mayoría de los recursos dirigidos a B7H3 se encuentran en la etapa inicial de desarrollo. Y-Mabs ha desarrollado omburtamab con radionúclidos que incluyen I131 o Lu177, y el recurso principal es I131-omburtamab dirigido a tumores cerebrales. Enoblituzumab es un anticuerpo B7H3 potenciado con Fc en fase I/II, mientras que se demostró una eficacia antitumoral limitada en pacientes refractarios a anti-PD1/PD-L1 cuando se combina con un anticuerpo anti-PD1. Los ADCs B7H3, incluido MGC018 de MacroGenics y DS-7300 de Daiichi Sankyo, mostraron actividad antitumoral preliminar en estudios de fase I y perfiles de seguridad bien tolerados.

25 **[007]** No existen anticuerpos terapéuticos aprobados contra B7H3, y sigue existiendo una necesidad médica no satisfecha de terapias dirigidas a B7H3.

SÍNTESIS DE LA DIVULGACIÓN

30 **[008]** La presente divulgación se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana.

[009] En formas de realización, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a 4Ig-B7H3 humana, que comprende:

(1) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (a) una HCDR1 (Región

Determinante de la Complementariedad de la Cadena Pesada 1) de SEQ ID NO: 7, (b) una HCDR2 de SEQ ID NO: 8, y (c) una HCDR3 de SEQ ID NO: 9; o

(2) una región variable de la cadena pesada que comprende (a) una HCDR1 de SEQ ID NO: 12, (b) una HCDR2 de SEQ ID NO: 13, y (c) una HCDR3 de SEQ ID NO: 14.

5 **[010]** En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(1) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 10;

(2) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90,
10 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 20;

(3) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 24;

(4) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 26;

15 (5) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 30;

(6) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 32;

(7) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90,
20 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 34;

(8) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 36;

(9) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 40;

25 (10) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 42;

(11) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 44;

(12) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos
30 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 46;

(13) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 48;

(14) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos

90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 50;

(15) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 15;

(16) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 52;

(17) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 54; o

(18) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 56.

10 **[011]** En formas de realización, en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos dentro de al menos una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, y SEQ ID NO: 56 se han
15 insertado, eliminado o sustituido.

[012] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

(1) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10;

(2) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 20;

20 (3) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 24;

(4) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 26;

(5) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 30;

(6) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 32;

(7) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 34;

25 (8) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 36;

(9) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 40;

(10) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 42;

(11) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 44;

(12) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 46;

30 (13) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 48;

(14) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 50;

(15) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15;

(16) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 52;

(17) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 54; o

(18) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 56.

[013] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo diseñado humano, un anticuerpo de cadena única (scFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un Fragmento F(ab')₂, un anticuerpo de cadena pesada (HcAb) o un VHH.

[014] En formas de realización, un anticuerpo multi-específico o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un primer antígeno tumoral humano (TAA), en donde el primer TAA es 4Ig-B7H3 humana y el primer dominio de unión a antígeno comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento; y al menos un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo TAA humano.

[015] En formas de realización, el anticuerpo multi-específico o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico.

[016] En formas de realización, el anticuerpo multi-específico o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un ligador de aminoácidos, y el ligador de aminoácidos es cualquier secuencia de SEQ ID NO: 79 a SEQ ID NO: 121.

[017] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada de la subclase de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y/o una región constante de cadena ligera del tipo de kappa o lambda.

[018] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada de la subclase de IgG1.

[019] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[020] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene glicosilación reducida o no tiene glicosilación o está hipofucosilado.

[021] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende estructuras de GlcNac bisectantes aumentadas.

[022] La presente divulgación también se refiere a un VHH, en donde dicho VHH se une específicamente a 4Ig-B7H3 humana.

[023] En formas de realización, el VHH comprende:

(1) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende (a) una HCDR1 (Región

Determinante de la Complementariedad de la Cadena Pesada 1) de SEQ ID NO: 7, (b) una HCDR2 de SEQ ID NO: 8, y (c) una HCDR3 de SEQ ID NO: 9; o

(2) una región variable de la cadena pesada que comprende (a) una HCDR1 de SEQ ID NO: 12, (b) una HCDR2 de SEQ ID NO: 13, y (c) una HCDR3 de SEQ ID NO: 14.

5 **[024]** En formas de realización, el VHH comprende:

(1) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 10;

(2) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 20;

10 (3) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 24;

(4) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 26;

15 (5) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 30;

(6) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 32;

(7) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 34;

20 (8) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 36;

(9) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 40;

25 (10) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 42;

(11) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 44;

(12) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 46;

30 (13) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 48;

(14) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 50;

(15) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 15;

(16) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 52;

5 (17) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 54; o

(18) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 56.

[025] En formas de realización, en el VHH, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o
10 diez aminoácidos dentro de al menos una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, y SEQ ID NO: 56 se han insertado, eliminado, o sustituido.

[026] En formas de realización, el VHH comprende:

15 (1) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10;

(2) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 20;

(3) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 24;

(4) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 26;

(5) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 30;

20 (6) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 32;

(7) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 34;

(8) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 36;

(9) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 40;

(10) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 42;

25 (11) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 44;

(12) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 46;

(13) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 48;

(14) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 50;

(15) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15;

30 (16) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 52;

(17) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 54; o

(18) una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 56.

[027] En formas de realización, un anticuerpo multi-específico o fragmento de unión a antígeno del

mismo comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un primer antígeno tumoral humano (TAA), en donde el primer TAA es 4Ig-B7H3 humana, y el primer dominio de unión a antígeno comprende el VHH descrito en el presente documento; y al menos un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo TAA humano.

- 5 **[028]** En formas de realización, el anticuerpo multi-específico o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo biespecífico.
- [029]** En formas de realización, el anticuerpo multi-específico o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un ligador de aminoácidos, y el ligador de aminoácidos es cualquier secuencia de SEQ ID NO: 79 a SEQ ID NO: 121.
- 10 **[030]** En formas de realización, una composición farmacéutica comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o VHH, descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.
- [031]** En formas de realización, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo divulgado en el presente documento.
- 15 **[032]** En formas de realización, la presente divulgación se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico divulgado en el presente documento.
- [033]** En formas de realización, la presente divulgación se refiere a una célula huésped que comprende el ácido nucleico o el vector divulgado en el presente documento.
- [034]** En formas de realización, la presente divulgación se refiere a un proceso para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende cultivar la célula huésped y recuperar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo divulgado en el presente documento a partir del cultivo.
- 20 **[035]** En formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o sus fragmentos de unión a antígeno tienen al menos una de las siguientes características:
- 25 (1) unión específica y alta afinidad por 4Ig-B7H3 humana;
- (2) ser un anticuerpo humanizado que tiene un riesgo de inmunogenicidad bajo para los humanos; y
- (3) buena pureza y fácil de purificar.
- [036]** En formas de realización, la presente divulgación proporciona VHH anti-4Ig-B7H3 humana que están altamente humanizados y tienen un riesgo de inmunogenicidad bajo para los humanos, mientras mantienen la unión específica y una alta afinidad con la 4Ig-B7H3 humana, y/o exhiben una alta pureza y son fáciles de purificar.
- 30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[037] La **Figura 1** muestra la unión de BGA-026 y BGA-056 al antígeno B7H3 mediante ELISA.

[038] La **Figura 2** muestra la unión de BGA-026 y BGA-056 a células HEK293 mediante citometría de flujo.

[039] La **Figura 3** muestra la unión de BGA-026 quimérico y BGA-2042 a células H358 mediante
5 citometría de flujo.

[040] La **Figura 4** muestra la unión de BGA-056 quimérico y BGA-174 a células H358 mediante citometría de flujo.

[041] Las **Figuras 5A-5B** muestran la unión de VHH1_C001 y VHH1_C002 a la línea celular de
cáncer H358 positiva para B7H3 (**Figura 5A**) y la línea celular de cáncer MDA-MB-453 positiva para
10 B7H3 (**Figura 5B**) por citometría de flujo.

[042] Las **Figuras 6A-6D** muestran la unión de VHH1_C001 y VHH1_C002 a 4-Ig-B7H3 y
2Ig-B7H3 por resonancia de plasmón superficial (SPR).

[043] La **Figura 7** muestra el agrupamiento de epítomos de VHH1_C001 y VHH1_C002.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

[044] La presente divulgación se refiere a anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana y a sus fragmentos de
unión a antígeno. Los anticuerpos divulgados tienen afinidades de unión deseables y otros atributos
deseables, tales como un bajo riesgo de inmunogenicidad para los humanos. Los anticuerpos anti-4Ig-
B7H3 humana y sus fragmentos de anticuerpos se pueden utilizar para construir anticuerpos multi-
20 específicos con funcionalidades adicionales, tales como la unión de un segundo antígeno asociado a
tumores humanos (TAA), inhibición de punto de control inmunológico o estimulación inmune, para
construir conjugados de fármaco de anticuerpo (ADC), o fusionarse con otros dominios para formar
proteínas de fusión. Además, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 y sus constructo, o las composiciones
farmacéuticas que los comprenden, se podrían utilizar para tratar cánceres que expresan 4Ig-B7H3 y
25 trastornos asociados.

Definiciones

[045] A menos que se defina específicamente a continuación o en otra parte de este documento, todos
los demás términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado
comúnmente entendido por un experto en la técnica.

30 [046] Como se utiliza en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas
singulares de palabras tales como “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen sus correspondientes referencias en
plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[047] El término "o" se utiliza para significar, y se utiliza indistintamente con, el término "y/o" a

menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[048] A menos que se indique específicamente o sea evidente por el contexto, como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a un valor o composición que está dentro de un rango de error aceptable para el valor o composición particular según lo determine un experto en la técnica. lo cual dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor o composición, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de una o más de una desviación estándar según la práctica en la técnica. "Aproximadamente" puede significar un rango de hasta el 10% (es decir, $\pm 10\%$). Por lo tanto, se puede entender que "aproximadamente" está dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, o 0,001% mayor o menor que el valor indicado. Por ejemplo, aproximadamente 5 mg pueden incluir cualquier cantidad entre 4,5 mg y 5,5 mg. Además, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta cinco veces un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, se debe asumir que el significado de "aproximadamente" se encuentra dentro de un rango de error aceptable para ese valor o composición en particular.

[049] El término "4Ig-B7H3 humana" se refiere a la isoforma 4Ig de una proteína transmembrana de tipo I B7H3 en seres humanos. La secuencia de ácido nucleico de 4Ig-B7H3 humana se establece en la SEQ ID NO: 1, basada en la secuencia de GenBank No. de acceso: NM_001024736.1. La secuencia de aminoácidos de 4Ig-B7H3 humana es SEQ ID NO: 2.

[050] Los términos "administración" y "administrar", tal como se utilizan en el presente documento, cuando se aplican a un animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico, significan el contacto de un agente o composición farmacéutica, terapéutica o diagnóstica exógena con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula.

[051] El término "sujeto" o "paciente" en el presente documento incluye cualquier organismo, de modo preferente un animal, de modo más preferente un mamífero (por ejemplo, rata, ratón, perro, gato, conejo, primate) y lo más preferente un ser humano (por ejemplo, un paciente). que comprende, o está en riesgo de tener, un trastorno descrito en el presente documento).

[052] "Tratar" cualquier enfermedad o trastorno se refiere en un aspecto a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otro aspecto, "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico, incluidos aquellos que pueden no ser discernibles por el

paciente. En incluso otro aspecto, "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos.

[053] El término "afinidad" como se utiliza en el presente documento se refiere a la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno. Dentro del antígeno, las regiones variables del anticuerpo interactúan mediante fuerzas no covalentes con el antígeno en numerosos sitios. En general, cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

[054] El término "anticuerpo" ("Ab"), como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas que puede unirse a un antígeno correspondiente de forma no covalente, reversible y de una manera específica. Por ejemplo, un anticuerpo IgG de origen natural es un tetrámero que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como VL o Vκ) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se componen por tres CDR y cuatro regiones marco (FR) dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

[055] Las posiciones de las CDR y las regiones marco se pueden determinar utilizando diversas definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Kabat, Chothia, AbM e IMGT (véase, por ejemplo, Johnson et al., *Nucleic Acids Res.*, 29:205–206 (2001); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901–917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342:877–883 (1989); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 227:799–817 (1992); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.*, 273:927–748 (1997); Lefranc, M.–P., *The Immunologist*, 7, 132–136 (1999); Lefranc, M.–P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55–77 (2003)).

[056] El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y

anticuerpos humanos diseñados. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo/clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

[057] El término "anticuerpo quimérico" significa moléculas formadas por dominios de diferentes especies, es decir, que fusionan el dominio variable de un anticuerpo de una especie huésped (por ejemplo, ratón, conejo, llama, etc.) con el dominio constante de un anticuerpo de una especie diferente (por ejemplo, humana).

[058] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 comprenden al menos un sitio de unión al antígeno, que puede ser al menos una región variable. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo 4Ig-B7H3 descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-4Ig-B7H3 está aislado o es recombinante. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 también abarcan anticuerpos multiespecíficos que se dirigen a 4Ig-B7H3 como al menos un brazo y se dirigen a otro(s) antígeno(s) como otro(s) brazo(s).

[059] El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" o "Mab" en el presente documento significa una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, las moléculas de anticuerpo en la población son idénticas en la secuencia de aminoácidos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) normalmente incluyen una multitud de anticuerpos diferentes que tienen diferentes secuencias de aminoácidos en sus dominios variables, particularmente sus CDR, que a menudo son específicas para diferentes epítopos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Los anticuerpos monoclonales (mAb) se pueden obtener mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo Kohler et al., Nature 1975 256:495-497; U.S. Pat. No. 4.376.110; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 1992; Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold spring Harbor Laboratory 1988; y Colligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 1993. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgD, IgE, IgA y cualquiera de sus subclases, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Se pueden obtener títulos elevados de anticuerpos monoclonales en la producción *in vivo*, donde se inyectan células de los hibridomas individuales por vía intraperitoneal en ratones, tales como ratones Balb/c cebados con pristina para producir líquido ascítico que contiene altas concentraciones de los anticuerpos deseados. Los

anticuerpos monoclonales de isotipo IgM o IgG se pueden purificar a partir de dichos líquidos ascíticos o de sobrenadantes de cultivo, utilizando métodos de cromatografía en columna bien conocidos por los expertos en la técnica.

[060] En general, la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una "cadena ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "cadena pesada" (aproximadamente 50–70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de la cadena pesada puede definir una región constante responsable principalmente de la función efectora. Normalmente, las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas humanas normalmente se clasifican como α , δ , ϵ , γ o μ , y definen los isotipos del anticuerpo como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente.

[061] Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más.

[062] Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada (VL/VH) forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, en general, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son, en general, los mismos en la secuencia primaria.

[063] Normalmente, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera comprenden tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad (CDR)", que se encuentran entre regiones marco (FR) relativamente conservadas. Las CDR suelen estar alineadas por las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. En general, desde el N-terminal al C-terminal, los dominios variables de cadena ligera y pesada comprenden FR-1 (o FR1), CDR-1 (o CDR1), FR-2 (FR2), CDR-2 (CDR2), FR-3 (FR3), CDR-3 (CDR3) y FR-4 (FR4). Las posiciones de las CDR y las regiones marco pueden determinarse utilizando diversas definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Kabat, Chothia, AbM, e IMGT (véase, por ejemplo, Johnson et al., *Nucleic Acids Res.*, 29:205–206 (2001); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901–917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342:877–883 (1989); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 227:799–817 (1992); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.*, 273:927–748 (1997) ImMunoGenTics (IMGT) numbering (Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132–136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55–77 (2003) ("IMGT" numbering scheme)). Las definiciones de los sitios de combinación de antígenos también se describen en lo siguiente: Ruiz et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:219–221 (2000); y Lefranc, M. P., *Nucleic*

Acids Res., 29:207–209 (2001); MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732–745 (1996); y Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268–9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121–153 (1991); y Rees et al., In Sternberg M. J. E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141–172 (1996). Por ejemplo, según Kabat, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de cadena pesada (VH) están numerados del 31–35 (HCDR1), del 50–65 (HCDR2) y del 95–102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de la cadena ligera (VL) están numerados del 24–34 (LCDR1), del 50–56 (LCDR2) y del 89–97 (LCDR3). Según Chothia, los aminoácidos de CDR en la VH están numerados del 26–32 (HCDR1), del 52–56 (HCDR2) y del 95–102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos en VL están numerados del 26–32 (LCDR1), del 50–52 (LCDR2) y del 91–96 (LCDR3). Al combinar las definiciones de CDR de Kabat y Chothia, las CDR constan de los residuos de aminoácidos 26–35 (HCDR1), 50–65 (HCDR2) y 95–102 (HCDR3) en VH humana y los residuos de aminoácidos 24–34 (LCDR1), 50–56 (LCDR2) y 89–97 (LCDR3) en VL humana. Según IMGT, los residuos de aminoácidos de CDR en la VH se numeran aproximadamente 26–35 (HCDR1), 51–57 (HCDR2) y 93–102 (HCDR3), y los residuos de aminoácidos de CDR en la VL se numeran aproximadamente 27–32 (LCDR1), 50–52 (LCDR2) y 89–97 (LCDR3) (numeración según Kabat). Según IMGT, las regiones CDR de un anticuerpo se pueden determinar utilizando el programa IMGT/DomainGap Align.

[064] El término "región hipervariable" significa los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "CDR" (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en el dominio variable de la cadena ligera y HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en el dominio variable de la cadena pesada). Véase Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (que define las regiones CDR de un anticuerpo por secuencia); véase también Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901–917 (que define las regiones CDR de un anticuerpo por estructura). El término residuos "marco" o "FR" significa aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable definidos en el presente documento como residuos CDR.

[065] A menos que se indique lo contrario, un "fragmento de unión a antígeno" significa fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, es decir, fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos que retienen uno o más regiones CDR. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario, por ejemplo, Fv monocatenario (ScFv); nanocuerpos (o

anticuerpo VHH); anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos; y péptidos bicíclicos (Hurov, K. et al., 2021. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(11)).

[066] Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno "se une específicamente" a un antígeno (por ejemplo, una proteína), lo que significa que el anticuerpo muestra una unión preferencial a ese objetivo en comparación con otras proteínas, pero esta especificidad no requiere especificidad de unión absoluta. Una reacción de unión "específica" o "selectiva" es determinante de la presencia del antígeno en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos, por ejemplo, en una muestra biológica, sangre, suero, plasma o muestra de tejido. Por lo tanto, bajo ciertas condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a un antígeno particular al menos dos veces en comparación con el nivel de fondo y no se unen específicamente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. En un aspecto, en condiciones de inmunoensayo designadas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno particular al menos diez veces en comparación con el nivel de unión de fondo y no se une específicamente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra.

[067] El "dominio de unión a antígeno", como se utiliza en el presente documento, comprende al menos seis CDR (o tres CDR en términos de anticuerpo de dominio único) y se une específicamente a un epítipo. Un "dominio de unión a antígeno" de un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un primer epítipo y un segundo dominio de unión a antígeno que también comprende al menos tres CDR que se une específicamente a un segundo epítipo. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos, etc., con dominios de unión a antígeno dirigidos a cada epítipo específico. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser multivalentes (por ejemplo, un anticuerpo tetravalente biespecífico) que comprende múltiples dominios de unión a antígeno, por ejemplo, 2, 3, 4 o más dominios de unión a antígeno que se unen específicamente a un primer epítipo y 2, 3, 4, o más dominios de unión a antígeno que se unen específicamente a un segundo epítipo. Un "dominio de unión a antígeno" de un anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, un anticuerpo de cadena pesada, o un VHH, comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un epítipo sin emparejarse con un dominio variable adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un único dominio VH/VHH o VL.

[068] Los términos "dominio VHH", "anticuerpo VHH", "fragmento de anticuerpo VHH" y "VHH" (también conocido como nanocuerpo), como se utilizan en el presente documento, se refieren a lo que se describió originalmente como el dominio de unión al antígeno de anticuerpos de cadena pesada

únicamente producidos por camélidos (*Naturally occurring antibodies devoid of light chains*, C. Hamers–Casterman et al., *Nature*, volume 363, pages 446–448 (1993)) y se distingue de los dominios variables de la cadena pesada (dominio VH) de un anticuerpo tetrámero convencional. El anticuerpo VHH conserva el pliegue de inmunoglobulina de los anticuerpos convencionales de cuatro cadenas, con sólo tres bucles hipervariables (CDR1, CDR2 y CDR3) para unirse a su objetivo. Muchos VHH se unen a sus objetivos con afinidades similares a las de los anticuerpos convencionales de tamaño completo y pueden poseer otras propiedades superiores a las de los anticuerpos convencionales de tamaño completo.

[069] El término "anticuerpo humano" en el presente documento significa un anticuerpo que comprende sólo secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano puede contener cadenas de carbohidratos murinos si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De manera similar, "anticuerpo de ratón" o "anticuerpo de rata" significan un anticuerpo que comprende sólo secuencias de proteínas de inmunoglobulina de ratón o de rata, respectivamente.

[070] El término "humanizado" o "anticuerpo humanizado" significa formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos, de conejo, de llama, etc.), así como de anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos de los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. El prefijo "hum", "hu", "Hu" o "h" se agrega a las designaciones de clones de anticuerpos cuando es necesario para distinguir los anticuerpos humanizados de los anticuerpos parentales (por ejemplo, de roedores). Las formas humanizadas de anticuerpos de roedor generalmente comprenderán las mismas secuencias CDR de los anticuerpos de roedor parentales, aunque se pueden incluir ciertas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado, eliminar una modificación postraducciona l o por otras razones.

[071] El término "secuencia de línea germinal humana correspondiente" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de región variable humana que comparte la identidad de secuencia de aminoácidos determinada más alta con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de región variable de referencia en comparación con todas otras

secuencias de aminoácidos de regiones variables conocidas codificadas por secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas de línea germinal humana. La secuencia de línea germinal humana correspondiente también puede referirse a la secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable humana con la mayor identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable de referencia en comparación con todas las demás secuencias de aminoácidos de la región variable evaluadas. La correspondiente secuencia de la línea germinal humana puede ser solo regiones marco, solo regiones determinantes de complementariedad, regiones marco y determinantes de complementariedad, una región variable u otras combinaciones de secuencias o subsecuencias. La identidad de secuencia se puede determinar utilizando los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, alineando dos secuencias utilizando BLAST, ALIGN u otro algoritmo de alineación conocido en la técnica. La secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de la línea germinal humana correspondiente puede tener al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la región variable de referencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de dichas secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpos que contienen secuencias marco de consenso derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57–86, 2000.

[072] El término "constante de disociación de equilibrio" o "KD" o "M" se refiere a la constante de velocidad de disociación (k_d , tiempo⁻¹) dividida por la constante de velocidad de asociación (k_a , tiempo⁻¹, M⁻¹). Las constantes de disociación de equilibrio se pueden medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente divulgación generalmente tendrán una constante de disociación de equilibrio de menos de aproximadamente 10^{-7} o 10^{-8} M, por ejemplo, menos de aproximadamente 10^{-9} M o 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, o 10^{-13} M.

[073] El término "cáncer" o "tumor" utilizado en el presente documento tiene el significado más amplio tal como se entiende en la técnica y se refiere a la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. En el contexto de la presente divulgación, el cáncer no se limita a un determinado tipo o ubicación.

[074] En el contexto de la presente divulgación, cuando se hace referencia a una secuencia de aminoácidos, el término "sustitución conservativa" significa sustitución del aminoácido original por un nuevo aminoácido que no altera sustancialmente las propiedades químicas, físicas y/o propiedades funcionales del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, su afinidad de unión a 4Ig-B7H3. Las subestaciones conservadoras comunes de aminoácidos son bien conocidas en la técnica.

[075] El término tecnología de "botón en ojal" como se utiliza en el presente documento se refiere a aminoácidos que dirigen el emparejamiento de dos polipéptidos juntos ya sea *in vitro* o *in vivo* mediante la introducción de una protuberancia espacial (botón) en un polipéptido y un hueco o cavidad. (ojal) en el otro polipéptido en una interfaz en la que interactúan. Por ejemplo, se han introducido botones en ojales en las interfaces de unión Fc:Fc, interfaces C_L:C_HI o interfaces VH/VL de anticuerpos (véanse, por ejemplo, los documentos US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431, y Zhu et al., 1997, Protein Science, 6:781–788). En algunas formas de realización, los botones en ojales garantizan el emparejamiento correcto de dos cadenas pesadas diferentes durante la fabricación de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos que tienen aminoácidos de botón en ojal en sus regiones Fc pueden comprender además dominios variables únicos unidos a cada región Fc, o comprender además diferentes dominios variables de cadena pesada que se emparejan con dominios variables de cadena ligera similares o diferentes. La tecnología de botón en ojal también se puede utilizar en las regiones VH o VL para garantizar también el emparejamiento correcto.

[076] Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST, que se describen en Altschul et al, Nuc. Acids Res. 25:3389–3402, 1977; and Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403–410, 1990, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas. Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como valores para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización por residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae en una cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W,

T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras.

[077] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, de modo más preferente menor que aproximadamente 0,01 y lo más preferente menor que aproximadamente 0,001.

[078] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Aplica. Biosci. 4: 11-17, (1988), que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se pueden determinar utilizando Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, (1970), algoritmo que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG utilizando una matriz BLOSUM62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

[079] El término "ácido nucleico" se utiliza en el presente documento indistintamente con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos de cadena principal modificados o enlaces, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metilribonucleótidos y ácidos péptidonucleicos (PNA).

[080] El término "unido operativamente" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a una relación

funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Normalmente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora transcripcional con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está operativamente unida a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias reguladoras transcripcionales promotoras que están operativamente unidas a una secuencia transcrita son físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, actúan en cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras transcripcionales, tales como los potenciadores, no necesitan ser físicamente contiguas ni estar ubicadas muy cerca de las secuencias codificantes cuya transcripción mejoran.

[081] En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen anticuerpos anti-4Ig-B7H3 como se describe en el presente documento, que se formulan junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. El excipiente puede ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, rectal, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

[082] Las composiciones descritas en el presente documento pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, liposomas y supositorios. Una forma adecuada depende del modo de administración y aplicación terapéutica previstos. Un modo de administración adecuado es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En algunas formas de realización, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

[083] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad de un anticuerpo que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, o al menos uno de los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad, trastorno o síntoma. La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar con el anticuerpo, la enfermedad, trastorno y/o síntomas de la enfermedad o trastorno, la gravedad de la enfermedad, trastorno y/o síntomas de la enfermedad o trastorno, la edad del sujeto a tratar, y/o el peso del sujeto a tratar. Una cantidad apropiada en cualquier caso dado puede resultar evidente para los expertos en la técnica o puede determinarse mediante experimentos de rutina. En el

caso de la terapia de combinación, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad total de los componentes de la combinación.

[084] El término "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico. Dicha administración abarca la co-administración de estos agentes terapéuticos de manera sustancialmente simultánea. Dicha administración también abarca la co-administración en múltiples o separados recipientes o formulaciones (por ejemplo, cápsulas, polvos y líquidos) para cada ingrediente activo. Los polvos y/o líquidos se pueden reconstituir o diluir hasta una dosis deseada antes de la administración. Además, la "terapia de combinación" abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de manera secuencial, ya sea aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de las afecciones o trastornos descritos en el presente documento.

[085] Como se utiliza en el presente documento, la frase "en combinación con" significa que un anticuerpo anti-4IG-B7H3 se administra al sujeto al mismo tiempo, justo antes o justo después de la administración de un agente terapéutico adicional. En ciertas formas de realización, se administra un anticuerpo anti-4Ig-B7H3 como una co-formulación con un agente terapéutico adicional.

Anticuerpos Anti-4Ig-B7H3

Tabla 1: Secuencias de anticuerpos anti-4Ig-B7H3

<u>Anticuerpo</u>	<u>SEQ ID NO</u>		<u>Secuencia</u>
BGA-026	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG

	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 10	VHH AA	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDNANTVYLQMNNLKPED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGTQV TVSS
	SEQ ID NO: 19	VHH ADN	GAAGTGCAACTGGTGGAGTCCGGCGGCG GGCTGGTCCAAACCGGGACAGCCTGAG ACTGAGCTGCGCCGCCTCCCCTAGAACCT TTCAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGAC AAGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGT GAGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAA GCTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGA TTCACCATCAGCAGAGACAACGCCAAGAA CACAGTGTACCTGCAGATGAACAACCTGA AGCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACA GAGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAA GGCACCCAAGTGACCGTGAGCAGC
BGA-154	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2	NWSGGT

		(Chothia)	
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 20	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
BGA-1541	SEQ ID NO: 21	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
	SEQ ID NO: 64	HCDR1 (IMGT)	GRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS

	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKSGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 65	HCDR1 (Chothia)	GRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 22	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 23	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCAGAACCTT TCAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGAC AAGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGT GAGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAA GCTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGA TTCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAA CACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGA GAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACA GAGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAA GGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

BGA-1542	SEQ ID NO: 66	HCDR1 (IMGT)	PFTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 67	HCDR1 (Chothia)	PFTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 24	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPFTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 25	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTTTCACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG

			AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-1543	SEQ ID NO: 68	HCDR1 (IMGT)	PRTFSTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 69	HCDR1 (Chothia)	PRTFSTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 26	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFST YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 27	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT AGCACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA

			AGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCGTGACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-1544	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 28	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWVRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCAAKGSPTYDREGEYDYWGQGLV TVSS

	SEQ ID NO: 29	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGGTGAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-1545	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 30	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT

			YFMGWFRQAPGKGREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCAA KSGTYDREGEYDYWGQGLTV TVSS
	SEQ ID NO: 31	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGGCAGAGAGTTCGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-1546	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG

	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 32	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKELEFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 33	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGCTGGAGTTCGTGA GCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGC TACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATT CACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-1547	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2	NWSGGT

		(Chothia)	
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 34	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKEREWVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 35	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTGGGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCGTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-1548	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS

	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 36	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSPTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 37	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

BGA-1549	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 70	HCDR3 (IMGT)	AKKGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 38	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQTYFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYKDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKGSPTYDREGEYDYWGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO: 39	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGCCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG

			AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCAAGAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-2041	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 40	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKGLEWVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 41	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA

			AGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-2042	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKSGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KSGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KSGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 42	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAKSGSGTYDREGEYDYWGQGTLV TVSS

	SEQ ID NO: 43	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-2043	SEQ ID NO: 66	HCDR1 (IMGT)	PFTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 67	HCDR1 (Chothia)	PFTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 44	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPFTFQT

			YFMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLTV TVSS
	SEQ ID NO: 45	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTTTCACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-2044	SEQ ID NO: 68	HCDR1 (IMGT)	PRTFSTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKSGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 69	HCDR1 (Chothia)	PRTFSTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KSGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG

	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 46	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFST YFMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 47	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT AGCACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
BGA-2045	SEQ ID NO: 71	HCDR1 (IMGT)	PFTFSTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS
	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 72	HCDR1 (Chothia)	PFTFSTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2	NWSGGT

		(Chothia)	
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 48	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPFTFST YFMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
BGA-2046	SEQ ID NO: 49	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTTTCACCTTT AGCACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
	SEQ ID NO: 59	HCDR1 (IMGT)	PRTFQTYF
	SEQ ID NO: 60	HCDR2 (IMGT)	INWSGGTS

	SEQ ID NO: 61	HCDR3 (IMGT)	AAKGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Chothia)	PRTFQTY
	SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Chothia)	NWSGGT
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	KGSPTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 50	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKGREWVSVINWSGGTSYY KDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAKGSPTYDREGEYDYWGQGLV TVSS
	SEQ ID NO: 51	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGG GCCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTT CAGACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACA AGCCCCCGGCAAGGGCAGAGAGTGGGTG AGCGTGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAG CTACTACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG CCGCCAAGGGCAGCGGCACCTACGACAG AGAGGGCGAGTACGACTACTGGGGCCAAG GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

Tabla 2: Secuencias de anticuerpos anti-4Ig-B7H3

<u>Anticuerpo</u>	<u>SEQ ID NO</u>		<u>Secuencia</u>
BGA-056	SEQ ID NO: 73	HCDR1 (IMGT)	GFTFSDYH
	SEQ ID NO: 74	HCDR2 (IMGT)	ILNTGLSP
	SEQ ID NO: 75	HCDR3 (IMGT)	AQGYYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 76	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
	SEQ ID NO: 77	HCDR2 (Chothia)	LNTGLS
	SEQ ID NO: 14	HCDR3 (Chothia)	GYYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 12	CDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	CDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	CDR3 (Kabat)	GYYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 15	VHH AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD YHMSWVRQAPGKGLEWVSGILNTGLSPTYA ATVTGRFTISRDNKNTLYLSMNSLPEDTA VYYCAQGYYRATPSQANRGQGTQVTVSS
	SEQ ID NO: 122	VHH ADN	GAGGTGCAACTGCTGGAGTCCGGCGGGGG CCTGGTGCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTCA GCGACTACCACATGAGCTGGGTGAGACAA GCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG CGGCATCCTGAACACCGGCCTGAGCCCCA

			CCTACGCCGCCACCGTGACCGGCAGATTCA CCATCAGCAGAGATAACGCCAAAAACACC CTGTACCTGAGCATGAACAGCCTGAAGCCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCA AGGCTACTACAGAGGCCACCCCTAGCCAAG CCAACAGAGGCCAAGGCACCCAAGTGACC GTGAGCAGC
BGA-174	SEQ ID NO: 76	HCDR1 (IMGT)	GFTFSDY
	SEQ ID NO: 74	HCDR2 (IMGT)	ILNTGLSP
	SEQ ID NO: 75	HCDR3 (IMGT)	AQGYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 76	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
	SEQ ID NO: 77	HCDR2 (Chothia)	LNTGLS
	SEQ ID NO: 14	HCDR3 (Chothia)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 12	HCDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	HCDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	HCDR3 (Kabat)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 52	VHH AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD YHMSWVRQAPGKGLEWVSGILNTGLSPTYA ATVTGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAQGYRATPSQANRGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO: 53	VHH ADN	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGGGG GCTCGTGCAGCCCGGGGGCAGCCTGAGAC

			TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCA GCGACTACCACATGAGCTGGGTGAGACAA GCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG CGGCATCCTGAACACCGGCCTGAGCCCCA CCTACGCCGCCACCGTGACCGGCAGATTCA CCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACC CTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC AAGGCTACTACAGAGCCACCCCTAGCCAA GCCAACAGAGGCCAAGGCACCCTGGTGAC CGTGAGCAGC
BGA-1741	SEQ ID NO: 73	HCDR1 (IMGT)	GFTFSDYH
	SEQ ID NO: 74	HCDR2 (IMGT)	ILNTGLSP
	SEQ ID NO: 78	HCDR3 (IMGT)	AKGYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 76	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
	SEQ ID NO: 77	HCDR2 (Chothia)	LNTGLS
	SEQ ID NO: 14	HCDR3 (Chothia)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 12	HCDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	HCDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	HCDR3 (Kabat)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 54	VHH AA	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAASGFTFSD YHMSWVRQAPGKLEWVSGILNTGLSPTYA ATVTGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA

			VYYCAKGYRATPSQANRGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO: 55	VHH ADN	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGGGG GCTCGTGCAGCCCGGGGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCA GCGACTACCACATGAGCTGGGTGAGACAA GCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG CGGCATCCTGAACACCGGCCTGAGCCCCA CCTACGCCGCCACCGTGACCGGCAGATTCA CCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACC CTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGC CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCA AGGGCTACTACAGAGCCACCCCTAGCCAA GCCAACAGAGGCCAAGGCACCCTGGTGAC CGTGAGCAGC
BGA-1742	SEQ ID NO: 73	HCDR1 (IMGT)	GFTFSDYH
	SEQ ID NO: 74	HCDR2 (IMGT)	ILNTGLSP
	SEQ ID NO: 75	HCDR3 (IMGT)	AQGYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 76	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
	SEQ ID NO: 77	HCDR2 (Chothia)	LNTGLS
	SEQ ID NO: 14	HCDR3 (Chothia)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 12	HCDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	HCDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	HCDR3	GYRATPSQAN

		(Kabat)	
	SEQ ID NO: 56	VHH AA	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y H M S W V R Q A P G K G L E W V S G I L N T G L S P T Y A A T V T G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A Q G Y Y R A T P S Q A N W G Q G T L V T V S S
	SEQ ID NO: 57	VHH ADN	G A A G T G C A G C T G C T G G A A T C C G G G G G G G G G G C T C G T G C A G C C C G G G G G C A G C C T G A G A C T G A G C T G C G C C G C T A G C G G C T T C A C C T T C A G C G A C T A C C A C A T G A G C T G G G T G A G A C A A G C C C C C G G C A A G G G C C T G G A G T G G G T G A G C G G C A T C C T G A A C A C C G G C C T G A G C C C C A C C T A C G C C G C C A C C G T G A C C G G C A G A T T C A C C A T C A G C A G A G A C A A C A G C A A G A A C A C C C T G T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C C A A G G C T A C T A C A G A G C C A C C C C T A G C C A A G C C A A C T G G G G C C A A G G C A C C C T G G T G A C C G T G A G C A G C

[086] La presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana (es decir, anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se pueden producir como se describe a continuación.

[087] En formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) incluyen un dominio de región variable (VH) de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, o SEQ ID NO: 56 (**Tablas 1–2**). En formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno comprenden una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) que tiene una secuencia de

aminoácidos de cualquiera de las HCDR enumeradas en las **Tablas 1–2**. En un aspecto, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno incluyen una, dos, tres o más HCDR que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las HCDR enumeradas en las **Tablas 1–2**.

[088] En una forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana incluyen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO : 8, y SEQ ID NO: 9; o seleccionada de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14.

[089] En una forma de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden: (i) una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 de la VH expuesta en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, o SEQ ID NO: 56.

[090] En otra forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana comprenden: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende tres HCDR que son HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, de acuerdo con la numeración de Kabat.

[091] En otra forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana comprenden: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende tres HCDR que son HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, de acuerdo con la numeración de Kabat.

[092] En una forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación comprenden: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, o SEQ ID NO: 56, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una cualquiera o más de SEQ ID NO: 10,

SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, y SEQ ID NO: 56.

[093] Otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación incluyen aminoácidos que se han cambiado, pero que aún tienen al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% por ciento de identidad en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR divulgadas en las **Tablas 1–2**. En algunos aspectos, las regiones CDR incluyen cambios de aminoácidos (inserción, delección o sustitución, que pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras) en donde no se han cambiado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR descritas en las **Tablas 1–2**, manteniendo al mismo tiempo la especificidad y afinidad de unión.

[094] Otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación incluyen aquellos en los que los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han cambiado en las regiones variables (por ejemplo, las regiones marco de las regiones variables), pero tienen al menos 60, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con las secuencias de las regiones variables descritas en las **Tablas 1–2**, conservando al mismo tiempo la especificidad/afinidad de unión. En algunas formas de realización, las secuencias correspondientes de las CDR no cambian. En algunos aspectos, no se han cambiado más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos en las regiones variables (por ejemplo, las regiones marco de las regiones variables) en comparación con las regiones variables divulgadas en las **Tablas 1–2**, mientras que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos retienen la especificidad/afinidad de unión. En algunas formas de realización, las secuencias correspondientes de CDR no cambian.

[095] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a 4Ig–B7H3 humana e incluye una VH que comprende (a) una HCDR1 de SEQ ID NO: 7, (b) una HCDR2 de SEQ ID NO: 8, y (c) una HCDR3 de SEQ ID NO: 9, y los aminoácidos P26, F37 y A94 en la región marco se conservan.

[096] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti–4Ig–B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en la Tabla 1, o una variante de los mismos, en donde HCDR1, HCDR2 y HCDR3 no están cambiados y los aminoácidos P26, F37 y A94 se conservan.

[097] En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a 4Ig–B7H3 humana e

incluyen una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a al menos una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, o SEQ ID NO: 50, en donde se conservan los aminoácidos P26, F37 y A94 en la región marco.

[098] En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana con una afinidad de unión (K_D) de 1×10^{-6} M a 1×10^{-11} M. En otra forma de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 o sus fragmentos de unión a antígeno se unen a 4Ig-B7H3 humana con una afinidad de unión (K_D) de aproximadamente 1×10^{-6} M, aproximadamente 1×10^{-7} M, aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-9} M, aproximadamente 1×10^{-10} M o aproximadamente 1×10^{-11} M.

[099] La presente divulgación también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican VH o VL de los anticuerpos que se unen específicamente a 4Ig-B7H3 humana. Dichas secuencias de ácidos nucleicos pueden optimizarse para su expresión en células de mamíferos.

[0100] La presente divulgación también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 descritos en las **Tablas 1–2**. Por lo tanto, se pueden identificar anticuerpos adicionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos basándose en su capacidad para competir de forma cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión, de una manera estadísticamente significativa) con los anticuerpos descritos en las **Tablas 1–2** en ensayos de unión. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación a 4Ig-B7H3 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo para unirse a 4Ig-B7H3. Tal anticuerpo puede, sin estar vinculado a ninguna teoría, unirse al mismo epítipo o a uno relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente proximal) en 4Ig-B7H3 como el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo con los que compete. En cierto aspecto, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en 4Ig-B7H3 que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. Dichos anticuerpos monoclonales humanos o humanizados se pueden preparar y aislar como se describe en el presente documento.

[0101] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo diseñado humano, un anticuerpo de cadena única (scFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, o un VHH.

Anticuerpos multiespecíficos anti-4Ig-B7H3

[0102] En una forma de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento se pueden utilizar para construir anticuerpos multiespecíficos con funcionalidades adicionales, tales como la unión de un segundo antígeno asociado a tumores (TAA) humano, la inhibición del punto de control inmunitario o la estimulación inmunitaria. En algunos ejemplos, 4Ig-B7H3 funciona como un primer TAA.

[0103] En una forma de realización, los anticuerpos 4Ig-B7H3 o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento pueden incorporarse en un anticuerpo multiespecífico anti-4Ig-B7H3xTAA, en donde TAA es un anticuerpo o fragmento del mismo dirigido a cualquier antígeno asociado a tumor humano (TAA). Un anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica si, por ejemplo, comprende varios dominios de unión a antígeno, en donde al menos una secuencia del dominio de unión a antígeno se une específicamente a 4Ig-B7H3 y una segunda secuencia del dominio de unión a antígeno se une específicamente a un TAA. En formas de realización, el anticuerpo multiespecífico comprende un tercer, cuarto o quinto dominio de unión a antígeno. En formas de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo triespecífico o un anticuerpo tetraespecífico. En cada forma de realización, el anticuerpo multiespecífico comprende al menos un dominio de unión al antígeno anti-4Ig-B7H3 y al menos un dominio de unión al antígeno anti-TAA.

[0104] En una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo biespecífico se une específicamente sólo a dos antígenos. El anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a 4Ig-B7H3 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo TAA. Se incluye un anticuerpo biespecífico que comprende un segundo dominio variable de cadena pesada y un segundo dominio variable de cadena ligera que se une específicamente a un segundo TAA y un primer dominio variable de cadena pesada y/o un primer dominio variable de cadena ligera que se une específicamente a 4Ig-B7H3 humana. En otra forma de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a 4Ig-B7H3 y un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un TAA. Cuando el anticuerpo biespecífico comprende fragmentos de unión a antígeno, el fragmento de unión a antígeno puede ser un Fab, F(ab')₂, Fv, un Fv de cadena única (scFv) o un anticuerpo de dominio único.

[0105] En formas de realización, el anticuerpo multiespecífico de la presente divulgación se une a un segundo TAA humano y/o 4Ig-B7H3 humana con una afinidad de unión (K_D) de 1×10^{-6} M a 1×10^{-11}

M. En formas de realización, el anticuerpo multiespecífico de la presente divulgación se une a un segundo TAA humano y/o 4Ig-B7H3 humana con una afinidad de unión (K_D) de aproximadamente 1×10^{-6} M, aproximadamente 1×10^{-7} M, aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-9} M, aproximadamente 1×10^{-10} M o aproximadamente 1×10^{-11} M.

- 5 **[0106]** En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a 4Ig-B7H3 humana comprende el anticuerpo anti-4Ig-B7H3 humana o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento y el segundo dominio de unión a antígeno se une específicamente a un segundo TAA humano.
- 10 **[0107]** En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a 4Ig-B7H3 humana comprende al menos una de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48,
- 15 SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, o SEQ ID NO: 56, y el segundo dominio de unión a antígeno se une específicamente a un segundo TAA humano.

[0108] Experimentaciones anteriores (Coloma and Morrison, Nature Biotech. 15: 159–163 (1997)) describieron un anticuerpo biespecífico tetravalente que se diseñó fusionando ADN que codifica un anticuerpo anti-dansilo de cadena única Fv (scFv) después del extremo C terminal (CH3–scFv) o

20 después de la bisagra (bisagra–scFv) de un anticuerpo anti-dansilo IgG3. La presente divulgación proporciona anticuerpos multivalentes (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes) con al menos dos dominios de unión a antígeno, que pueden producirse fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende de tres a ocho, pero de modo preferente cuatro, dominios de unión a

25 antígeno que se unen específicamente a al menos dos antígenos.

[0109] En una forma de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En otra forma de realización, el anticuerpo multiespecífico comprende además un ligador de aminoácidos descrito en el presente documento, tal como cualquiera de SEQ ID NO: 79 a SEQ ID NO: 121.

Anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana conjugados con una citotoxina

- 30 **[0110]** Los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana actualmente descritos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden utilizar para construir conjugados de fármaco anticuerpo (ADC). En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga con una citotoxina. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se

conjuga con una citotoxina mediante un ligador de citotoxina.

Citotoxina

[0111] Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento, la viabilidad o la propagación de las células, incluidos, pero sin limitarse a, agentes que interactúan con la tubulina y agentes que dañan el ADN. Ejemplos de agentes citotóxicos y agentes quimioterapéuticos adecuados que se pueden conjugar con los anticuerpos de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, 1-(2cloroetil)-1,2-dimetanosulfonilhidrazida, 1,8-dihidroxi-biciclo[7.3.1]trideca-4,9-dieno-2,6-diino-13-ona, 1-deshidrotestosterona, 5-fluoruracilo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 9-amino camptotecina, actinomicina D, amanitinas, aminopterina, anguidina, antraciclina, antramicina (AMC), auristatinas, bleomicina, busulfán, ácido butírico, caliqueamicinas (por ejemplo, caliqueamicina gamma1), camptotecina, carminomicinas, carmustina, cemadotinas, cisplatino, colchicina, combretastatinas, ciclofosfamida, citarabina, citocalasina B, dactinomicina, daunorrubicina, decarbazina, diacetoxipentildoxorrubicina, dibromomanitol, dihidroxi antracina diona, disorazoles, dolastatina (por ejemplo, dolastatina 10), doxorubicina, duocarmicina, equinomicinas, eleuterobinas, emetina, epotilonas, esperamicina, estramustinas, bromuro de etidio, etopósido, fluoruracilos, geldanamycinas, gramicidina D, glucocorticoides, irinotecanos, inhibidores de la proteína fusiforme quinesina (KSP), leptomicinas, leurosinas, lidocaína, lomustina (CCNU), maitansinoides, mecloretamina, melfalán, mercaptopurinas, metopterinas, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, N8-acetil espermidina, podofilotoxinas, procaína, propranolol, pteridinas, puromicina, pirrolobenzodiazepinas (PBD), rizoxinas, estreptozotocina, talisomicinas, taxol, tenopósido, tetracaína, tioepa clorambucilo, tomaimicinas, topotecanos, tubulisina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y derivados de cualquiera de los anteriores.

Ligadores de citotoxinas

[0112] Los ligadores de citotoxina o ligadores para ADC son cualquier grupo o resto que une, conecta o enlaza el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento con un resto terapéutico, por ejemplo, un agente citotóxico. Se pueden encontrar ligadores adecuados, por ejemplo, en Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins; Phillips, G. L, Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; Antibody-Drug Conjugates; Ducry, L, Ed.; Humana Press, 2013; Antibody- Drug Conjugates; Wang, J., Shen, W.-C, and Zaro, J. L, Eds.; Springer International Publishing, 2015, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0113] Generalmente, los agentes de unión o ligadores de citotoxina adecuados para los conjugados de anticuerpos descritos en el presente documento son aquellos que son suficientemente estables para aprovechar la vida media circulante del anticuerpo y, al mismo tiempo, son capaces de liberar la carga

útil después de la internalización mediada por antígeno del conjugado. Los ligadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los ligadores escindibles incluyen ligadores que se escinden mediante metabolismo intracelular después de la internalización, por ejemplo, escisión mediante hidrólisis, reducción o reacción enzimática. Los ligadores no escindibles incluyen ligadores que liberan una carga útil unida mediante degradación lisosomal del anticuerpo después de la internalización. Los ligadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, ligadores lábiles a los ácidos, ligadores lábiles a la hidrólisis, ligadores escindibles enzimáticamente, ligadores lábiles a la reducción, ligadores auto-inmolativos y ligadores no escindibles. Los ligadores adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son o comprenden péptidos, glucurónidos, succinimida-tioéteres, unidades de polietilenglicol (PEG), hidrazonas, unidades de mal-caproílo, unidades de dipéptido, unidades de valina-citrulina y unidades de para-aminobencilo (PAB).

[0114] Se puede utilizar cualquier molécula ligadora de citotoxina o tecnología ligadora conocida en la técnica para crear o construir un ADC de la presente divulgación. En determinadas formas de realización, el ligador de citotoxina es un ligador escindible. De acuerdo con otras formas de realización, el ligador es un ligador no escindible. Los ligadores ejemplares que se pueden utilizar en el contexto de la presente divulgación incluyen ligadores que comprenden o consisten en, por ejemplo, GGFG, MC (6-maleimidocaproílo), MP (maleimidopropanoílo), val-cit (valina-citrulina), val-ala (valina-alanina) sitio dipéptido en un ligador escindible por proteasa, sitio dipéptido ala-phe (alanina-fenilalanina) en un ligador escindible por proteasa, PAB (p-aminobenciloxicarbonilo), SPP (4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo), SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo), SIAB ((4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo), y variantes y combinaciones de los mismos. Se proporcionan ejemplos adicionales de ligadores que se pueden utilizar en el contexto de la presente divulgación, por ejemplo, en el documento US 7.754.681 y en Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, 27:5-13, y las referencias citadas en el mismo, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0115] En determinadas formas de realización, los ligadores de citotoxina son estables en condiciones fisiológicas. En determinadas formas de realización, los ligadores son escindibles, por ejemplo, capaces de liberar al menos la porción de carga útil en presencia de una enzima o en un rango o valor de pH particular. En algunas formas de realización, un ligador comprende un resto escindible por enzima. Los restos escindibles por enzimas ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, enlaces peptídicos, enlaces éster, hidrazonas y enlaces disulfuro. En algunas formas de realización, el ligador comprende un ligador escindible por catepsina.

[0116] En algunas formas de realización, el ligador de citotoxina comprende un resto no escindible.

[0117] Los ligadores de citotoxina adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que están unidos químicamente a dos residuos de cisteína de un único agente de unión, por ejemplo, anticuerpo. Dichos ligadores pueden servir para imitar los enlaces disulfuro del anticuerpo que se alteran como resultado del proceso de conjugación.

- 5 [0118] En algunas formas de realización, el ligador de citotoxina comprende uno o más aminoácidos. Los aminoácidos adecuados incluyen aminoácidos naturales, no naturales, estándar, no estándar, proteinogénicos, no proteinogénicos y L o D. En algunas formas de realización, el ligador de citotoxina comprende alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, 10 arginina, histidina, o citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el ligador comprende valina y citrulina. En algunas formas de realización, el ligador de citotoxina comprende lisina, valina y citrulina. En algunas formas de realización, el ligador comprende lisina, valina y alanina. En algunas formas de realización, el ligador comprende valina y alanina.

15 **Proteína de fusión dirigida a 4Ig-B7H3 humana**

[0119] Los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento pueden fusionarse con otras proteínas u otros dominios funcionales para formar proteínas de fusión o proteínas quiméricas.

- [0120] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de 20 unión a antígeno de los mismos se fusionan con puntos de control inmunitarios, estimuladores inmunitarios, citocinas o un segundo TAA, ya sea directa o indirectamente a través de un ligador de aminoácidos descrito en el presente documento.

- [0121] En una forma de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se fusionan con dominios funcionales o subunidades receptoras que podrían 25 servir para transducir la señal del scFv/VHH y conferir especificidad de anticuerpo a células inmunitarias, tales como células T o células NK así como otras células efectoras.

- [0122] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se utilizan para construir receptores de antígenos quiméricos (CAR). Se puede encontrar información detallada sobre los constructos CAR en Guedan et al., Mol Ther 30 Methods Clin Dev 2019;12:145–156.

[0123] Los dominios funcionales o subunidades receptoras comprenden, por ejemplo, dominios transmembrana, regiones bisagra, dominios de señalización intracelular y dominios coestimuladores.

Modificaciones de Región Constante y Región Fc

- [0124]** La región constante de la cadena pesada podría ser las secuencias de tipo salvaje de la región constante de la cadena pesada de la subclase de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La región constante de la cadena ligera podría ser las secuencias de tipo salvaje de cadena ligera de tipo kappa o lambda. En una forma de realización, la región constante de la cadena pesada es la secuencia de tipo salvaje de la región constante de IgG1. La región constante de la cadena ligera es la secuencia de tipo salvaje de la cadena ligera de la cadena kappa. En una forma de realización, la región constante de la cadena pesada tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 18. En otra forma de realización, la región constante de la cadena pesada comprende las mutaciones E233P, L234A, L235A, G236del y P329A.
- [0125]** En una forma de realización, la región Fc podría ser una región Fc de tipo salvaje de la subclase de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio Fc de IgG1 o IgG4 con función efectora reducida.
- [0126]** En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio Fc con vida media extendida. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio Fc de IgG1, en donde se introdujo la mutación YTE (M252Y/S254T/T256E, numeración EU, como se describe en el documento US7658921) ubicada en CH2 de la región Fc de IgG.
- [0127]** En otra forma de realización, los anticuerpos de la presente divulgación tienen fuertes funciones efectoras mediadas por Fc, y los anticuerpos median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células objetivo.
- [0128]** En aspectos, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector por el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.
- [0129]** En otro aspecto, uno o más residuos de aminoácidos pueden reemplazarse con uno o más residuos de aminoácidos diferentes de modo que el anticuerpo tenga la unión a C1q alterada y/o haya reducido o abolido la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 6.194.551 de Idusogie et al.
- [0130]** En incluso otro aspecto, se cambian uno o más residuos de aminoácidos para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe, por ejemplo, en

la publicación WO 94/29351 de Bodmer et al. En un aspecto específico, uno o más aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación se reemplazan por uno o más residuos de aminoácidos alotípicos para la subclase IgG1 y el isotipo kappa. Los residuos de aminoácidos alotípicos también incluyen, pero no se limitan a, la región constante de la cadena pesada de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3, así como la región constante de la cadena ligera del isotipo kappa como se describe por Jefferis et al., MAbs. 1:332–338 (2009).

[0131] En otro aspecto, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en la publicación WO00/42072 de Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591–6604, 2001).

[0132] En incluso otro aspecto, se modifica la glicosilación del anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación o tiene una glicosilación reducida). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por un antígeno. Un enfoque de este tipo se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. Nos. 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

[0133] Además, o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNac bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que estos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con una vía de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con vías de glicosilación alteradas y se pueden utilizar como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación. La publicación WO 03/035835 de Presta describe una línea celular

CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos a Asn (297), lo que también produce hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733–26740). WO99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosiltransferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)–N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas exhiben estructuras GlcNac bisectantes aumentadas, lo que da como resultado una mayor actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., Nat. Biotech. 17:176–180, 1999).

[0134] En otro aspecto, si se desea una reducción de ADCC, en muchos informes anteriores se demostró que la subclase de anticuerpos humanos IgG4 tiene solo ADCC modesta y casi ninguna función efectora de CDC (Moore G L, et al., 2010 MAbs, 2:181–189). Sin embargo, se encontró que la IgG4 natural era menos estable en condiciones de estrés tales como en buffer ácido o bajo temperatura creciente (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105–108; Dall'Acqua, W. et al., 1998 Biochemistry, 37: 9266–9273; Aalberse et al., 2002 Immunol, 105:9–19). Se puede lograr una ADCC reducida uniendo operativamente el anticuerpo a un Fc de IgG4 diseñado con combinaciones de alteraciones que reducen la unión de FcγR o las actividades de unión de C1q, reduciendo o eliminando así las funciones efectoras de ADCC y CDC. Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de un anticuerpo como un fármaco biológico, una de las propiedades intrínsecas menos deseables de la IgG4 es la separación dinámica de sus dos cadenas pesadas en solución para formar medio anticuerpo, lo que conduce a anticuerpos biespecíficos generados *in vivo* mediante un proceso. llamado “intercambio de brazo Fab” (Van der Neut Kolfshoten M, et al., 2007 Science, 317:1554–157). La mutación de serina a prolina en la posición 228 (sistema de numeración EU) parecía inhibidora de la separación de la cadena pesada de IgG4 (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105–108; Aalberse et al., 2002 Immunol, 105:9–19). Se informó que algunos de los residuos de aminoácidos en la región bisagra y γFc tienen impacto en la interacción del anticuerpo con los receptores Fcγ (Chappel S M, et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9036–9040; Mukherjee, J. et al., 1995 FASEB J, 9:115–119; Armour, K. L. et al., 1999 Eur J Immunol, 29:2613–2624; Clynes, R. A. et al, 2000 Nature Medicine, 6:443–446; Arnold J. N., 2007 Annu Rev immunol, 25:21–50). Además, algunas isoformas de IgG4 que aparecen raramente en la población humana también pueden provocar diferentes propiedades fisicoquímicas (Brusco, A. et al., 1998 Eur J Immunogenet, 25:349–55; Aalberse et al., 2002 Immunol, 105:9–19). Para generar anticuerpos con ADCC y CDC bajos pero con buena estabilidad, es posible modificar la región bisagra y Fc de la IgG4 humana e introducir una serie de alteraciones. Estas moléculas de Fc de IgG4 modificadas se pueden encontrar en las SEQ ID NO: 83–88, Patente de EE. UU. No. 8.735.553 de Li et

al.

[0135] En otra forma de realización, los anticuerpos de la presente divulgación comprenden un dominio Fc de IgG4 humana con sustituciones S228P y/o R409K (de acuerdo con el sistema de numeración de EU).

5 **Ligadores de Aminoácidos**

[0136] Los dominios y/o regiones de las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos tetravalentes biespecíficos o constructos descritos en el presente documento pueden estar separados por regiones ligadoras de diversas longitudes. En algunas formas de realización, los dominios de unión al antígeno están separados entre sí, de un CL, CH1, bisagra, CH2, CH3 o de la región Fc completa mediante una
10 región ligadora. Por ejemplo, las cadenas polipeptídicas pueden incluir la secuencia VL1–CL–(ligador) VH2–CH1, VH–ligador–VL. Dichas regiones ligadoras pueden comprender una variedad aleatoria de aminoácidos o un conjunto restringido de aminoácidos. Dichas regiones ligadoras pueden ser flexibles o rígidas (véase US2009/0155275). La inclusión de un ligador de aminoácidos tiene poca o ninguna influencia sobre la actividad de los anticuerpos descritos en el presente documento.

[0137] Se han construido anticuerpos multiespecíficos fusionando genéticamente dos fragmentos Fv (scFv) o Fab de cadena única con o sin el uso de ligadores flexibles (Mallender et al., J. Biol. Chem. 1994 269:199–206; Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995 92:7021–5; Zapata et al., Protein Eng. 1995 8:1057–62); mediante un dispositivo de dimerización tal como cremallera de leucina (Kostelny et al., J. Immunol. 1992 148:1547–53; de Kruif et al. J. Biol. Chem. 1996 271:7630–4) y
20 dominios C/CH1 de Ig (Muller et al., FEBS Lett. 422:259–64); por diacuerpo (Holliger et al., (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998 90:6444–8; Zhu et al., Bio/Technology (NY) 1996 14:192–6); fusión Fab–scFv (Schoonjans et al., J. Immunol. 2000 165:7050–7); y formatos de minianticuerpos (Pack et al., Biochemistry 1992 31:1579–84; Pack et al., Bio/Technology 1993 11:1271–7).

[0138] Los anticuerpos multiespecíficos y constructos como se divulgan en el presente documento pueden incluir una región conectora de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,
25 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o más residuos de aminoácidos entre uno o más de sus dominios de unión a antígeno, dominios CL, dominios CH1, regiones bisagra, dominios CH2, dominios CH3 o regiones Fc. En algunas formas de realización, la región ligadora está compuesta por los aminoácidos glicina y serina. El ligador puede incluir la secuencia GS (SEQ ID NO: 79), GGS (SEQ ID NO: 80), GSG (SEQ ID NO: 81), SGG (SEQ ID NO: 82), GGG (SEQ ID NO: 83), GGGS (SEQ ID NO: 84), SGGG (SEQ ID NO: 85), GGGGS (SEQ ID NO: 86), GGGGSGS (SEQ ID NO: 87), GGGGSGS (SEQ ID NO: 88), GGGGSGGS (SEQ ID NO: 89), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 90), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 91), AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 92),
30

AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 93), AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 94), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 95), AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 96), SAKTTP (SEQ ID NO: 97), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 98), RADAAP (SEQ ID NO: 99), RADAAPTVS (SEQ ID NO: 100), RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 101), RADAAAA(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 102), SAKTTP (SEQ ID NO: 103), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 104), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 105), ADAAP (SEQ ID NO: 106), ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 107), TVAAP (SEQ ID NO: 108), TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 109), QPKAAP (SEQ ID NO: 110), QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 111), AKTTPP (SEQ ID NO: 112), AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 113), AKTTAP (SEQ ID NO: 114), AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 115), ASTKGP (SEQ ID NO: 116), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 117), GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 118), GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 119), y GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 120), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 121) o cualquier combinación de las mismas (véase el documento WO2007/024715).

Aminoácidos Específicos de Dimerización

[0139] En una forma de realización, los anticuerpos multivalentes o constructos comprenden al menos un cambio de aminoácido específico de la dimerización. El cambio de aminoácido específico de la dimerización puede dar como resultado interacciones de "botón en ojal" y puede aumentar la probabilidad de un ensamblaje correcto de los anticuerpos multivalentes deseados. Los aminoácidos específicos de dimerización pueden estar dentro del dominio CH1 o el dominio CL o combinaciones de los mismos. Los aminoácidos específicos de la dimerización adecuados utilizados para emparejar dominios CH1 con otros dominios CH1 (CH1-CH1) y dominios CL con otros dominios CL (CL-CL) se pueden encontrar al menos en las divulgaciones de los documentos WO2014082179, WO2015181805 y WO2017059551. Los aminoácidos específicos de la dimerización también pueden estar dentro del dominio Fc y pueden estar en combinación con aminoácidos específicos de la dimerización dentro de los dominios CH1 o CL. En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de aminoácidos específico de la dimerización.

Producción de Anticuerpos

[0140] Los anticuerpos anti-B7H3 y sus fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, expresión recombinante, síntesis química y digestión enzimática de tetrámeros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales de longitud completa pueden obtenerse mediante, por ejemplo, hibridoma o producción recombinante. La expresión recombinante puede ser a partir de cualquier célula huésped apropiada conocida en la técnica, por ejemplo, células huésped de mamífero, células huésped bacterianas, células

huésped de levadura, células huésped de insecto, etc.

[0141] La divulgación proporciona además polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, polinucleótidos que codifican regiones o segmentos variables de la cadena pesada o ligera que comprenden las regiones determinantes de complementariedad como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica las regiones variables de la cadena pesada tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado de las **Tablas 1–2**.

[0142] Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar la secuencia de la región variable de un anticuerpo anti-B7H3. También pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de polinucleótidos codifican un polipéptido que comprende regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de uno de los anticuerpos anti-B7H3 ejemplificados.

[0143] En algunas formas de realización, los polinucleótidos descritos en el presente documento tienen codones optimizados para la expresión en células huésped, por ejemplo, células eucariotas, más específicamente células de mamíferos (por ejemplo, células CHO).

[0144] También se proporcionan en la presente divulgación vectores de expresión y células huésped para producir los anticuerpos anti-4Ig-B7H3. La elección del vector de expresión depende de las células huésped previstas en las que se va a expresar el vector. Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que están unidas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena de anticuerpo anti-4Ig-B7H3 o un fragmento de unión a antígeno. En algunos aspectos, se emplea un promotor inducible para prevenir la expresión de secuencias insertadas excepto bajo el control de condiciones inductoras. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inductoras sin sesgar a la población para que codifique secuencias cuyos productos de expresión sean mejor tolerados por las células huésped. Además de los promotores, también pueden ser necesarios o deseados otros elementos reguladores para la expresión eficaz de un anticuerpo anti-4Ig-B7H3 o un fragmento de unión a antígeno. Estos elementos normalmente incluyen un codón de iniciación ATG y un sitio de unión a ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; y Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Por ejemplo, se puede utilizar el potenciador SV40 o el potenciador CMV para

aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

[0145] Las células huésped para albergar y expresar los vectores de anticuerpos anti-4Ig-B7H3 pueden ser procariotas o eucariotas. *E. coli* es un huésped procariótico útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente divulgación. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis* y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, también se pueden crear vectores de expresión, que normalmente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores normalmente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. También se pueden emplear otros microbios, tales como la levadura, para expresar polipéptidos anti-4Ig-B7H3. También se pueden utilizar células de insecto en combinación con vectores de baculovirus.

[0146] En otros aspectos, se utilizan células huésped de mamífero para expresar y producir los polipéptidos anti-4Ig-B7H3 de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden ser una línea celular de hibridoma que exprese genes de inmunoglobulina endógena o una línea celular de mamífero que albergue un vector de expresión exógeno. Estos incluyen cualquier célula humana o animal mortal normal o inmortal normal o anormal. Por ejemplo, se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluidas las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HEK 293, líneas celulares de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso de cultivos de células de tejido de mamíferos para expresar polipéptidos se analiza generalmente en, por ejemplo, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY, N.Y., 1987.

Los vectores de expresión para células huésped de mamíferos pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49–68, 1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión normalmente contienen promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos de tipo celular, específicos de etapa y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de metalotioneína, el promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, el promotor MMTV inducible por dexametasona, el promotor

SV40, el promotor MRP polIII, el promotor constitutivo MPSV, el promotor CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor inmediato-temprano humano CMV), el promotor CMV constitutivo y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Métodos de Detección y Diagnóstico

5 **[0147]** Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación son útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, métodos para la detección de 4Ig-B7H3. En un aspecto, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son útiles para detectar la presencia de 4Ig-B7H3 en una muestra biológica. El término "detección", tal como se utiliza en el presente documento, incluye detección cuantitativa o cualitativa. En ciertos aspectos, una muestra biológica
10 comprende una célula o tejido. En otros aspectos, dichos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan 4Ig-B7H3 en niveles más altos en relación con otros tejidos.

[0148] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia de 4Ig-B7H3 en una muestra biológica. En ciertos aspectos, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-4Ig-B7H3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en
15 condiciones que permitan la unión del anticuerpo al antígeno y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el antígeno. La muestra biológica puede incluir, sin limitación, orina, tejido, esputo o sangre.

[0149] También se incluye un método para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión de 4Ig-B7H3. En ciertos aspectos, el método comprende poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-4Ig-B7H3; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativa o cualitativamente) de
20 4Ig-B7H3 expresado por la célula de prueba detectando la unión del anticuerpo anti-4Ig-B7H3 al polipéptido 4Ig-B7H3; y comparar el nivel de expresión por la célula de prueba con el nivel de expresión de 4Ig-B7H3 en una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de prueba o una célula que no expresa 4Ig-B7H3), en donde un nivel más alto de
25 expresión de 4Ig-B7H3 en la célula de prueba en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con la expresión de 4Ig-B7H3.

Composiciones y Formulaciones Farmacéuticas

[0150] También se proporcionan composiciones, que incluyen formulaciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-4Ig-B7H3, un fragmento de unión a antígeno del mismo, un
30 anticuerpo multiespecífico o polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo anti-4Ig-B7H3, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o anticuerpo multiespecífico. Estas composiciones pueden comprender además portadores adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen buffers, que son bien conocidos en la técnica.

- [0151]** Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-4Ig-B7H3 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a, buffers tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol bencílico o butílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas de hialuronidasa activa neutra soluble (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP ejemplares y métodos de uso, incluida rHuPH20, se describen en las Patentes de EE. UU. Nos. 7.871.607 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.
- [0152]** En la Patente de EE. UU. No. 6.267.958 se describen formulaciones de anticuerpos liofilizados ejemplares. Las formulaciones acuosas de anticuerpos incluyen las descritas en la Patente de EE. UU. No. 6.171.586 y el documento WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un buffer de acetato de histidina.
- [0153]** Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas.
- [0154]** Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* son generalmente

estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Equivalentes

5 [0155] Se debe entender que, si bien los anticuerpos anti-4Ig-B7H3 humana y sus fragmentos de unión a antígeno se han descrito junto con una descripción detallada de los mismos, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

10 [0156] Debe entenderse que una, algunas, cualquiera o todas las características de las diversas formas de realización descritas en el presente documento pueden combinarse para formar formas de realización adicionales de la presente divulgación. Estos y otros aspectos de la presente divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación de anticuerpo VHH anti-huB7H3

15 **Proteínas recombinantes B7H3 para campaña de fagos y ensayos de unión**

[0157] Para descubrir anticuerpos VHH contra B7H3 humana, se diseñaron y expresaron varias proteínas recombinantes para la selección y rastreo de fagos. Las regiones codificantes de ADNc para la 4Ig-B7H3 humana de longitud completa (hu 4Ig-B7H3) se ordenaron basándose en la secuencia B7H3 GenBank (No. de Registro: NM_001024736.1; el gen está disponible en Sinobio, Cat.: HG11188-M, y se hace referencia en el presente documento como SEQ ID NO: 1). En resumen, se
20 amplificó por PCR la región codificante del dominio extracelular (ECD) que consiste en los aminoácidos (AA) 29-466 de hu 4Ig-B7H3 (SEQ ID NO: 2). La región codificante de Fc de IgG1 humana (huIgG1) (SEQ ID NOs: 3-4) y Fc de IgG2a de ratón (mIgG2a) (SEQ ID NOs: 5-6) se amplificó por PCR y luego se conjugó con ECD (SEQ ID NO: 58) de hu 4Ig-B7H3 mediante ligación
25 para producir la proteína de fusión de huIgG1 Fc hu 4Ig-B7H3 ECD-huIgG1 y la proteína de fusión de mIgG2a Fc hu 4Ig-B7H3 ECD-mIgG2a. Luego, los productos de la PCR se clonaron en un vector de expresión basado en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), lo que dio como resultado plásmidos de expresión de la proteína de fusión Fc huIgG1 recombinante y de la proteína de fusión Fc mIgG2a. Para la producción de proteínas de fusión recombinantes, los plásmidos se transfectaron
30 transitoriamente en un sistema de expresión de células de mamíferos basado en HEK293 (desarrollado internamente) y se cultivaron durante 5-7 días en una incubadora de CO₂ equipada con un agitador giratorio. Los sobrenadantes que contenían las proteínas recombinantes se recogieron y se aclararon mediante centrifugación. Las proteínas recombinantes se purificaron mediante una columna de Proteína

A (Cat.: 17127901, GE Life Sciences) o agarosa Ni-NTA (Cat.: R90115, Invitrogen). Todas las proteínas recombinantes se dializaron frente a solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se almacenaron en un congelador a -80°C en pequeñas alícuotas.

Inmunización de llama y construcción de genoteca de fagos

5 **[0158]** Se inmunizó una llama con hu 4Ig-B7H3 ECD-mIgG2a. Dos semanas después de la cuarta inmunización, se recogieron PBMC de llama para la extracción de ARN, utilizando técnicas estándar (P. Chomczynski, et al., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical Biochem* 162(1) 1987 156–159).

[0159] Se construyó una genoteca de fagos mediante PCR de extensión de superposición-empalme y transcripción inversa. Los productos de la PCR se digirieron dos veces con NcoI/NotI y se ligaron en el vector fagémido Pcantab-5E. Luego, los repertorios se transformaron en bacterias *Escherichia coli* TG1 y se validaron mediante secuenciación de ADN Sanger de clones aleatorios (>96 clones analizados). Los fagos se purificaron mediante dos precipitaciones con PEG/NaCl directamente del sobrenadante del cultivo después de una etapa de rescate utilizando el fago auxiliar KM13. Se obtuvo
10 una genoteca con un tamaño $>10^7$ después de la transformación en bacterias *E. coli*.
15

Selección y rastreo de presentación de fagos

[0160] La selección de presentación en fagos se llevó a cabo mediante presentación de fagos utilizando protocolos estándar (Silacci et al., (2005) *Proteomics*, 5, 2340–50; Zhao et al., (2014) *PLoS One*, 9, e111339). En resumen, en las rondas 1 y 2 se utilizaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de ECD-huIgG1 de hu 4Ig-B7H3 inmovilizado en inmunotubos (Cat. 470319, ThermoFisher). Se utilizaron células NK92mi que sobreexpresan hu 4Ig-B7H3 (células NK92mi/hu 4Ig-B7H3) para la selección en la ronda 3. Los inmunotubos se bloquearon con leche en polvo al 5% (p/v) en PBS durante 1 hora. Se agotaron $2,69 \times 10^{12}$ (ronda 1) y $9,00 \times 10^{12}$ (ronda 2) de fagos mediante CD40-mIgG2a en PBS con leche desnatada al 5% durante 1 hora y luego se incubaron con el antígeno durante 1 hora. Para la tercera ronda de
20 selección, se llevó a cabo una selección celular utilizando células NK92mi/hu 4Ig-B7H3 con células NK92mi como células de agotamiento. Después de lavados con TBST, los fagos unidos se eluyeron con trietilamina 100 mM (Sigma-Aldrich). Se utilizaron fagos eluidos para infectar bacterias *E. coli* TG1 de fase logarítmica media y se sembraron en placas 2X YT suplementadas con glucosa al 2% y ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$. Después de tres rondas de selecciones, se seleccionaron clones individuales y se
25 prepararon sobrenadantes que contenían fagos utilizando protocolos estándar. Se utilizaron ELISA de fagos para rastrear anticuerpos anti-hu 4Ig-B7H3 VHH.
30

[0161] Para ELISA de fagos, se recubrió una inmunoplaaca Maxisorp con antígenos y se bloqueó con leche en polvo al 3% (p/v) en buffer PBS. Se agregó sobrenadante de fagos a los pocillos de la placa

ELISA durante 1 hora. Después de los lavados con TBST, se detectó el fago unido utilizando un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (SinoBiological) y un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Invitrogen).

Expresión y purificación de anticuerpos VHH de fusión Fc

5 [0162] Después se construyeron anticuerpos VHH anti-hu 4Ig-B7H3 como formato de anticuerpo VHH de fusión de Fc humano (VHH-Fc) utilizando vectores de expresión desarrollados internamente. Se fusionaron anticuerpos del dominio VHH en el terminal N de Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 17-18). La expresión y preparación de anticuerpos VHH de fusión de Fc se lograron mediante transfección en células 293G y mediante purificación utilizando una columna de Proteína A (GE Healthcare, 17-10 5438-02). Los anticuerpos purificados se concentraron en PBS y se almacenaron en alícuotas en un congelador a -80°C.

Ejemplo 2. Caracterización de anticuerpos VHH anti-hu 4Ig-B7H3 purificados

[0163] Para ELISA de antígeno, se recubrió una inmunoplaaca Maxisorp con antígeno hu 4Ig-B7H3 ECD-mIgG2a o B7H3-his de ratón (SinoBiological, 50973-M08H) y se bloqueó con BSA al 3% (p/v) en buffer PBS (buffer de bloqueo). Se agregaron anticuerpos monoclonales VHH a los pocillos de la 15 placa ELISA durante 1 hora. Después de los lavados con TBST, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP (Sigma, A0170) y un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Invitrogen). Los análisis ELISA de dos clones representativos, BGA-026 y BGA-056, se muestran en la **Figura 1**. Los resultados muestran que BGA-026 (SEQ ID NO: 7-11) 20 y BGA-056 (SEQ ID NOs: 12-16) se unen a hu 4Ig-B7H3 con buena afinidad en comparación con B7H3-His de ratón (SinoBiological, 50973-M08H).

[0164] Para la determinación de la afinidad, las afinidades de unión entre BGA-026 o BGA-056 y el antígeno humano B7H3 (ECD)-His (SinoBiological, 11188-H08H) se probaron mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR). Los resultados de los perfiles de unión determinados por 25 SPR de BGA-026 y BGA-056 se resumen en la **Tabla 3**. Tanto BGA-026 como BGA-056 mostraron una buena afinidad de unión con B7H3 humana.

Tabla 3. Afinidades de unión de BGA-026 y BGA-056 por SPR

VHH	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
BGA-026	2,47E+05	2,78E-04	1,13E-09
BGA-056	1,75E+05	1,07E-04	6,14E-10

[0165] Para el análisis de unión celular de BGA-026 y BGA-056, se sembraron células HEK293 en 30 una placa de 96 pocillos y se incubaron con una serie diluida de BGA-026 o BGA-056. Se utilizó el

anticuerpo IgG Fc antihumano Alexa Fluor® 647 (BioLegend, 410714) como un anticuerpo secundario para detectar la unión del anticuerpo a la superficie celular. Los valores de CE50 para la unión dependiente de la dosis a células HEK293 se determinaron ajustando los datos de dosis–respuesta con GraphPad Prism. Los resultados de los perfiles de unión celular de BGA–026 y BGA–056 se resumen en la **Figura 2** y la **Tabla 4**.

Tabla 4. Unión de BGA–026 y BGA–056 a HEK293

VHH	EC50 de la Unión de HEK293 (ug/ml)
BGA–026	0,02240
BGA–056	0,02190

[0166] Las secuencias de aminoácidos y de ADN de BGA–026 y BGA–056 se muestran en la **Tabla 5** a continuación.

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos y ADN de VHH anti–B7H3

Anticuerpo	SEQ ID NO		Secuencia
B7H3 Humana– longitud completa	SEQ ID NO: 1	ADN	ATGCTGCGTCGGCGGGGCGAGCCCTGGCATGG GTGTGCATGTGGGTGCAGCCCTGGGAGCACT GTGGTTCTGCCTCACAGGAGCCCTGGAGGTC CAGGTCCCTGAAGACCCAGTGGTGGCACTGG TGGGCACCGATGCCACCCTGTGCTGCTCCTTC TCCCCTGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCT CAACCTCATCTGGCAGCTGACAGATACCAAAC AGCTGGTGCACAGCTTTGCTGAGGGCCAGGA CCAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGCACGGCC CTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAGGGCAACG CATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCCTGTGGC GGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGC ATCCGGGATTTCCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCT GCAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGC ATGACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGC CAGGGGACACGGTGACCATCACGTGCTCCAG CTACCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCT GGCAGGATGGGCAGGGTGTGCCCTGACTGG CAACGTGACCACGTTCGCAGATGGCCAACGAG

			CAGGGCTTGTTTGATGTGCACAGCATCCTGCG GGTGGTGCTGGGTGCAAATGGCACCTACAGC TGCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAGG ATGCGCACAGCTCTGTCAACCATCACACCCAG AGAAGCCCCACAGGAGCCGTGGAGGTCCAG GTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGG GCACCGATGCCACCCTGCGCTGCTCCTTCTCC CCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCA ACCTCATCTGGCAGCTGACAGACACCAAACA GCTGGTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGAC CAGGGCAGCGCCTATGCCAACCGCACGGCCC TCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCA TCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCGTGTGGCGG ACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCAT CCGGGATTTCTGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTG CAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGCAT GACCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCA GGGGACACGGTGACCATCACGTGCTCCAGCT ACCGGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTG GCAGGATGGGCAGGGTGTGCCCCTGACTGGC AACGTGACCACGTCTGCAGATGGCCAACGAGC AGGGCTTGTTTGATGTGCACAGCGTCCTGCGG GTGGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCT GCCTGGTGCGCAACCCCGTGCTGCAGCAGGA TGCGCACGGCTCTGTCAACCATCACAGGGCAG CCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGT GACCGTGGGGCTGTCTGTCTGTCTCATTGCAC TGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGTGCTGGAGA AAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATG CAGGAGCTGAGGACCAGGATGGGGAGGGAG AAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAA ACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAA GAAATAGCCTGA
--	--	--	--

	SEQ ID NO: 2	AA	MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEV QVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGFSLAQLNL IWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPD LLAQGNASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIRDFGS AAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVIT CSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQM ANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ QDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVG TDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH SFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQ RVRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDTVITCSSYRGYPEAEVF WQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVL RVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQ PMTFPPEALWVTVGLSVCLIALVALAFVCWRK IKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHS SKEDDGQEIA
Hu 4Ig– B7H3 ECD (AA 29–466 de hu 4Ig– B7H3 de longitud completa)	SEQ ID NO: 58	AA	LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGFSLAQ LNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTAL FPDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSFTCFVSIRDF GSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVIT ITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQ MANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPV LQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVAL VGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQL VHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLR LQVRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY SKPSMTLEPNKDLRPGDTVITCSSYRGYPEAE VFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHS VLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFPPEA

huIgG1 Fc	SEQ ID NO: 3	ADN	GCTAGCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCAACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
	SEQ ID NO: 4	AA	ASEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

mIgG2a Fc	SEQ ID NO: 5	ADN	GCTAGCGAGCCCAGAGGGCCCCACAATCAAGC CCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAAC CTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCT CCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCT GAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATG TGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAG CTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACA GCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACA ACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCC ATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGG AGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGCCCT CCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAA CCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATA TGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACT AAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCA CAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAG TGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACT ACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGA TGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAG TGGAAGAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATA GCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTG CACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCG GACTCCGGGTAAA
	SEQ ID NO: 6	AA	ASEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKI KDVLMLISLSPMVTGVVVDVSEDDPDVQISWV NNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QD WMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTPGK

BGA-026	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 10	VHH AA	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCAASPRTFQTYF MGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYKDSV KGRFTISRDN AKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYC AAKGSGTYDREGEYDYWGQGTQVTVSS
	SEQ ID NO: 11	VHH ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGAT TGGTGCAGACTGGGGACTCTCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTCCACGCACCTTCCAGACCT ATTTCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGG AAGGAGCGTGAGTTTGTATCAGTTATTAAGT GAGTGGCGGTACCTCATACTATAAAGATTCCG TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA CGCCAAGAATACCGTGTATCTACAAATGAACA ACCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTAC TGTGCAGCTAAGGGGTCCGGTACTTACGACCG AGAGGGGGAATATGACTACTGGGGCCAGGGG ACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
BGA-056	SEQ ID NO: 12	CDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	CDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	CDR3 (Kabat)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 15	VHH AA	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYH MSWVRQAPGKGLEWVSGILNTGLSPTYAATVT GRFTISRDN AKNTLYLSMNSLKPEDTAVYYCAQ

			GYRATPSQANRGQGTQVTVSS
	SEQ ID NO: 16	VHH ADN	GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGATT ATCACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG AAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCAGGTATTCTT AATACAGGTCTTAGTCCAACCTTATGCAGCCA CCGTGACGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAATACGCTGTATCTCTCAATG AACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGT ATTATTGTGCCCAGGGATACTATCGAGCTAC CCCCTCCCAAGCCAACAGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA
Fc IgG1 humana	SEQ ID NO: 17	ADN	GAACCTAAATCATCAGATAAGACTCATACATG CCCTCCTTGCCCTGCACCTGAACTTCTTGGAG GACCTTCAGTGTTCTATTTCACCGAAACCT AAAGATACACTTATGATCTCAAGAACACCTGA AGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCACAC GAAGATCCTGAAGTGAAATTTAACTGGTACGT GGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCAAAGACC AAGCCTAGAGAAGAACAATACTCAACAT ACAGAGTGGTGTGAGTGCTTACAGTGCTTCAC CAAGATTGGCTTAACGGAAAGGAGTATAAATG CAAAGTGTCAAACAAAGCACTTCCTGCACCT ATCGAGAAGACCATTTCAAAAGCAAAAGGAC AACCTAGAGAACCTCAAGTGTACACACTTCCT CCTTCAAGAGAAGAAATGACAAAGAATCAGG TGTCGCTGACTTGTCTCGTCAAAGGATTCTAT CCATCAGATATCGCAGTGGAATGGGAATCAAA CGGACAACCTGAGAATAATTACAAGACTACGC CTCCTGTGCTTGATTCAGATGGATCATTCTTCC

			TATATTCAAAGCTGACGGTGGATAAATCAAGA TGGCAACAAGGAAACGTGTTCTCCTGTTTCAG TGATGCACGAAGCACTTCACAACCACTACAC ACAGAAAGTCCTTATCGTTGTCTCCCGGAAAG
	SEQ ID NO: 18	AA	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

Ejemplo 3. Humanización de BGA-026

[0167] Para la humanización de BGA-026, se buscaron genes de IgG de línea germinal humana en busca de secuencias que compartieran altos grados de homología con las secuencias de proteínas de las regiones variables de BGA-026 mediante una comparación contra la base de datos de genes de inmunoglobulina humana en IMGT. Se seleccionó como plantilla para la humanización el gen humano IGVH 3-23*04 que está presente en los repertorios de anticuerpos humanos con alta frecuencia y alta homología con BGA-026.

[0168] Las variantes humanizadas se construyeron en un formato VHH-IgG1 humana Fc (SEQ ID NO: 18) utilizando un vector de expresión desarrollado internamente, con sitios de subclonación de fácil adaptación. Las variantes humanizadas se expresaron mediante transfección de los constructos en células Expi293F y se purificaron utilizando una columna de proteína A (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences). El anticuerpo purificado se concentró a 0,5-5 mg/ml en PBS y se almacenó en alícuotas en un congelador a -80 °C.

Intercambio de marco basado en BGA-026

[0169] La humanización se llevó a cabo mediante injerto de CDR con retro-mutaciones clave conservadas. Los anticuerpos VHH humanizados de BGA-026 se diseñaron en un formato VHH-IgG1 humana Fc utilizando un vector de expresión desarrollado internamente. En la ronda inicial de humanización, las mutaciones de la región variable de camélido a residuos de aminoácidos humanos en regiones marco se guiaron mediante análisis de estructura 3D. Los residuos marco de camélido con

importancia estructural para mantener la estructura canónica de las CDR se conservaron en la primera ronda de humanización, incluidos nueve residuos de aminoácidos: P26, R27, Q30, F37, E44, R45, F47, V78 y A94 (numeración de Kabat), dando como resultado BGA–154 (**Tabla 9**; SEQ ID NO: 20 a 21). La afinidad de unión entre BGA–154 y B7H3 humana (ECD)–His (Cat: 11188–H08H, SinoBiological) se probó utilizando SPR. BGA–154 tiene buena afinidad de unión, comparable con el anticuerpo quimérico de camélido BGA–026 (**Tabla 6**).

Variantes con mutaciones puntuales basadas en BGA–154

[0170] Se realizó una mutación puntual única basada en BGA–154 para las nueve retro–mutaciones anteriores para explorar su significado (BGA–1541 a BGA–1549; **Tabla 9**; SEQ ID NO: 22 a 39).

[0171] Las afinidades de unión de BGA–1541 a BGA–1549 se probaron mediante SPR utilizando B7H3 humana (ECD)–His (Cat: 11188–H08H, SinoBiological) y se muestran en la **Tabla 6**. Análisis de SPR de BGA–1541 a BGA–1549. 1549 determinó tres sitios críticos de retro–mutación: P26, F37 y A94.

Tabla 6. Afinidades de unión de variantes con mutaciones puntuales basadas en BGA–154

VHH	Mutaciones	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	Relación K_D con respecto a BGA–026 quimérico	Pureza SEC–HPLC
BGA–026		9,74E+05	2,55E–04	2,62E–10	1,00	97,74
BGA–154	P26, R27, Q30, F37, E44, R45, F47, V78, A94	8,53E+05	2,01E–04	2,36E–10	0,90	96,01
BGA–1541	P26G	Sin unión	Sin unión	Sin unión	–	–
BGA–1542	R27F	1,24E+06	5,39E–04	4,34E–10	1,66	94,06
BGA–1543	Q30S	1,23E+06	6,16E–04	5,01E–10	1,91	96,74
BGA–1544	F37V	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	–	–

BGA-1545	E44G	8,98E+05	2,36E-04	2,63E-10	1,00	96,98
BGA-1546	R45L	9,24E+05	2,73E-04	2,95E-10	1,13	97,18
BGA-1547	F47W	1,65E+06	4,38E-04	2,65E-10	1,01	95,78
BGA-1548	V78L	9,01E+05	2,05E-04	2,27E-10	0,87	95,61
BGA-1549	A94K	Sin expresión	Sin expresión	Sin expresión	—	—

[0172] Manteniendo los tres aminoácidos (P26, F37, A94) retromutados, se llevó a cabo una mutación combinacional de los otros seis sitios de aminoácidos para generar BGA-2041 a BGA-2046 (**Tabla 7**; SEQ ID NO: 40 a 51). Las afinidades de unión de BGA-2041 a BGA-2046 analizadas mediante SPR se muestran en la **Tabla 7**. Todos BGA-2041 a BGA-2046 tienen buena afinidad de unión a B7H3 humana. El análisis SPR de BGA-2041 a BGA-2046 reveló que las variantes BGA-2041, BGA-2042 y BGA-2046 tienen una afinidad comparable a la del anticuerpo quimérico BGA-026.

[0173] Se construyeron anticuerpos VHH anti-hu 4Ig-B7H3 como formato de anticuerpo VHH de fusión de Fc humano (VHH-Fc) utilizando vectores de expresión desarrollados internamente. La expresión y preparación de anticuerpos VHH de fusión de Fc se lograron mediante transfección en células 293G y mediante purificación utilizando una columna de Proteína A (GE Healthcare, 17-5438-02). Los anticuerpos purificados se concentraron en PBS y se almacenaron en alícuotas en un congelador a -80°C. Todos los anticuerpos analizados (consulte la **Tabla 6** y la **Tabla 7**), excepto BGA-1541, BGA-1544 y BGA-1549, exhiben buena afinidad y alta pureza, y son fáciles de purificar.

Tabla 7. Afinidades de unión de variantes con mutaciones combinacionales basadas en BGA-154

VHH	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (M)	Relación K_D con respecto a BGA-026 quimérico	Pureza SEC-HPLC
BGA-026	7,04E+05	3,42E-04	4,86E-10	1,00	97,74
BGA-2041	4,11E+05	3,88E-04	9,44E-10	1,94	94,37
BGA-2042	4,48E+05	3,70E-04	8,25E-10	1,70	97,87
BGA-2043	4,15E+05	1,05E-03	2,53E-09	5,21	97,54

BGA-2044	5,37E+05	4,96E-03	9,25E-09	19,03	96,97
BGA-2045	6,46E+05	1,46E-02	2,25E-08	46,30	97,49
BGA-2046	4,36E+05	2,67E-04	6,12E-10	1,26	97,68

Determinación de la unión celular de variantes humanizadas de BGA-026

[0174] Se utilizó la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas H358, que expresa de forma nativa altos niveles de B7H3, para evaluar la actividad de unión del anticuerpo quimérico BGA-026 y la variante humanizada BGA-2042. Se sembraron células H358 en una placa de 96 pocillos y se incubaron con una serie diluida de anticuerpo quimérico BGA-026 y la variante humanizada BGA-2042. Se utilizó anti-IgG humana de cabra como un anticuerpo secundario para detectar la unión del anticuerpo a la superficie celular. Los valores de EC50 para la unión dependiente de la dosis a células H358 se determinaron ajustando los datos de dosis-respuesta al modelo logístico de cuatro parámetros con GraphPad Prism. Los datos mostrados en la **Figura 3** y la **Tabla 8** demuestran que la variante humanizada BGA-2042 exhibe una afinidad de unión comparable al anticuerpo quimérico BGA-026 y tiene la capacidad de unirse a B7H3 nativa en las células.

Tabla 8. Unión de BGA-026 quimérico y VHH BGA-2042 humanizado a células H358

VHH	EC50 de la unión a H358 (ug/mL)
BGA-026 quimérico	0,263
BGA-2042	0,357

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos y ADN de BGA-026 y sus variantes humanizadas

Anticuerpo	SEQ ID NO		SECUENCIA
BGA-026	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 10	VHH AA	EVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCAASPRTFQTYFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYKD

			SVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLKPEDTAV YYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGTQVTVSS
	SEQ ID NO: 19	VHH ADN	GAAGTGCAACTGGTGGAGTCCGGCGGCGG GCTGGTCCAAACCGGGGACAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCCTCCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACGCCAAGAACACAGTG TACCTGCAGATGAACAACCTGAAGCCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCAAGT GACCGTGAGCAGC
BGA-154	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 20	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGTQVTV SS
	SEQ ID NO: 21	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAAACCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC

			CCCC GGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCA AGGGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGC GAGTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTG GTGACCGTGAGCAGC
BGA-1541	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 22	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLVTV SS
	SEQ ID NO: 23	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCGGCAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCC GGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCA AGGGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGC

			GAGTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTG GTGACCGTGAGCAGC
BGA-1542	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 24	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPFTFQT YFMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGTLVTV SS
	SEQ ID NO: 25	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTTTCACCTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-1543	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG

	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 26	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFSTY FMGWFRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYKD SVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGT LVT VSS
	SEQ ID NO: 27	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTAG CACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-1544	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 28	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWVRQAPGKEREFVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGT LVT V SS

	SEQ ID NO: 29	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGGTGAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-1545	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 30	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKGREFVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLVTV SS
	SEQ ID NO: 31	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGGCAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA

			TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-1546	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 32	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKELEFVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLVTV SS
	SEQ ID NO: 33	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGCTGGAGTTCGTGAGCGT GATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACTA CAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCAT CAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTGT ACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC

BGA-1547	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 34	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKEREWVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLVTV SS
	SEQ ID NO: 35	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGAGAGAGTGGGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-1548	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 36	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT

			YFMGWFRQAPGKEREFSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAA KSGSGTYDREGEYDYWGQGLVTV SS
	SEQ ID NO: 37	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-1549	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KSGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 38	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQT YFMGWFRQAPGKEREFSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAKKSGSGTYDREGEYDYWGQGLVTV SS
	SEQ ID NO: 39	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT

			GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGAGAGAGTTCGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCGTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-2041	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 40	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQTY FMGWFRQAPGKGLEWVSVINWSGGTSYYKD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO: 41	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG

			GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-2042	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 42	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQTY FMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYYKD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO: 43	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-2043	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG

	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 44	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPFTFQTY FMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYYKD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGT LVTVSS
	SEQ ID NO: 45	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTTTCACCTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-2044	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 46	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFSTY FMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYYKD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGT LVTVSS
	SEQ ID NO: 47	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG

			CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTAG CACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-2045	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 48	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPFTFSTY FMGWFRQAPGKELEWVSVINWSGGTSYYKD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO: 49	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTTTCACCTTTAGC ACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGCC CCCGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTGAGCGT GATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACTA CAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCAT CAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGT ACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG

			GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC
BGA-2046	SEQ ID NO: 7	CDR1 (Kabat)	TYFMG
	SEQ ID NO: 8	CDR2 (Kabat)	VINWSGGTSYYKDSVKG
	SEQ ID NO: 9	CDR3 (Kabat)	KGSGTYDREGEYDY
	SEQ ID NO: 50	VHH AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPRTFQTY FMGWFRQAPGKGREWVSVINWSGGTSYYK DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAAKGSGTYDREGEYDYWGQGLTVTS S
	SEQ ID NO: 51	VHH ADN	GAGGTGCAACTCGTGGAGAGCGGCGGGGG CCTGGTCCAACCCGGGGGCAGCCTGAGACT GAGCTGCGCCGCTAGCCCTAGAACCTTTCA GACCTACTTCATGGGCTGGTTCAGACAAGC CCCCGGCAAGGGCAGAGAGTGGGTGAGCG TGATCAACTGGAGCGGCGGCACAAGCTACT ACAAGGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCCAAG GGCAGCGGCACCTACGACAGAGAGGGCGA GTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGT GACCGTGAGCAGC

[0175] Para la humanización de BGA-056, se buscaron genes de IgG de línea germinal humana en busca de secuencias que compartieran altos grados de homología con las secuencias de proteínas de las regiones variables de BGA-056 mediante comparación contra la base de datos de genes de inmunoglobulina humana en IMGT. Se seleccionó como plantilla para la humanización el gen humano IGVH 3-23*01 que está presente en los repertorios de anticuerpos humanos con alta frecuencia y alta homología con BGA-056.

[0176] Las variantes humanizadas se construyeron en un formato VHH-IgG1 humana Fc utilizando un vector de expresión desarrollado internamente, con sitios de subclonación de fácil adaptación. Las variantes humanizadas se expresaron mediante transfección de los constructos en células Expi293F y se purificaron utilizando una columna de proteína A (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences). El anticuerpo purificado se concentró a 0,5-5 mg/ml en PBS y se almacenó en alícuotas en un congelador a -80°C.

Intercambio de marco basado en BGA-056

[0177] La humanización se llevó a cabo mediante injerto de CDR con retro-mutaciones clave conservadas. Los anticuerpos VHH humanizados de BGA-056 se diseñaron en un formato VHH-IgG1 humana Fc utilizando un vector de expresión desarrollado internamente. En la ronda inicial de humanización, las mutaciones de la región variable de camélido a residuos de aminoácidos humanos en regiones marco se guiaron mediante análisis de estructura 3D. Los residuos marco de camélido con importancia estructural para mantener la estructura canónica de las CDR se conservaron en la primera ronda de humanización, incluidos dos residuos de aminoácidos, Q94 y R103 (numeración de Kabat), lo que dio como resultado BGA-174 (**Tabla 10**; SEQ ID NO: 52-53). BGA-174 tiene una afinidad de unión comparable con el anticuerpo quimérico de camélido BGA-056 (**Tabla 10**), lo que indica que esta característica se conserva.

Variantes con mutaciones puntuales basadas en BGA-174

[0178] Se realizó una mutación puntual única basada en BGA-174 para las dos retro-mutaciones anteriores para explorar su significado (BGA-1741 y BGA-1742; **Tabla 10**; SEQ ID NO: 54 a 57). Las afinidades de unión de BGA-1741 y BGA-1742 se probaron mediante SPR y se muestran en la **Tabla 10**. BGA-174, BGA-1741 y BGA-1742 tienen una afinidad comparable a la de BGA-056.

[0179] Se construyeron anticuerpos VHH anti-hu 4Ig-B7H3 como formato de anticuerpo VHH de fusión de Fc humano (VHH-Fc) utilizando vectores de expresión desarrollados internamente. La expresión y preparación de anticuerpos VHH de fusión de Fc se lograron mediante transfección en células 293G y mediante purificación utilizando una columna de Proteína A (GE Healthcare, 17-5438-02). BGA-174, BGA-1741 y BGA-1742 humanizados exhiben una gran afinidad y alta pureza, y son fáciles de purificar.

Tabla 10. Afinidades de unión de variantes con mutaciones puntuales basadas en BGA-174

VHH	Mutación en BGA-056	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	Relación K_D con respecto a BGA-056 quimérico	Pureza SEC-HPLC
BGA-056		1,03E+06	1,03E-04	1,00E-10	1,00	88,39
BGA-174	Q94, R103	9,63E+05	1,06E-04	1,10E-10	1,10	95,33
BGA-1741	Q94K	8,28E+05	1,71E-04	2,06E-10	2,06	95,64
BGA-1742	R103W	8,40E+05	4,00E-04	4,76E-10	4,76	92,64

Determinación de la unión celular de variantes humanizadas de BGA-056

[0180] Se utilizó la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas H358, que expresa de forma nativa altos niveles de B7H3, para evaluar la actividad de unión del anticuerpo quimérico BGA-056 y la variante humanizada BGA-174. Se sembraron células H358 en una placa de 96 pocillos y se incubaron con una serie diluida de anticuerpo quimérico BGA-056 o variante humanizada BGA-174. Se utilizó anti-IgG humana de cabra como un anticuerpo secundario para detectar la unión del anticuerpo a la superficie celular. Los valores de EC50 para la unión dependiente de la dosis a líneas celulares que expresan B7H3 se determinaron ajustando los datos de dosis-respuesta al modelo logístico de cuatro parámetros con GraphPad Prism. Los datos mostrados en la **Figura 4** y la **Tabla 11** demuestran que la variante humanizada BGA-174 exhibe una afinidad de unión comparable al anticuerpo quimérico BGA-056.

Tabla 11. Unión de BGA-056 quimérico y VHH BGA-174 humanizado a H358

VHH	EC50 de la unión H358 (ug/mL)
BGA-056 quimérico	0,452
BGA-174	0,289

Determinación de afinidad de BGA-174 y BGA-174

[0181] Las construcciones etiquetadas con His se prepararon añadiendo la etiqueta 6xHis al extremo C de cada uno de BGA-2042 (SEQ ID NO: 42) (“VHH1_C001”) y BGA-174 (SEQ ID NO: 52) (“VHH1_C002”). La afinidad de unión y las constantes de cinética de los fragmentos de VHH purificados se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore 8K) a 25 °C. Se

acoplaron proteínas 4Ig-B7H3 (Cat: 11188-H02H) y 2Ig-B7H3 (Cat: B73-H5253) a un sensor CM5 Biocore derivado a través de acoplamiento de aminas con anticuerpo de IgG anti-humano (Cat: 29234600). Los fragmentos de VHH luego se hicieron fluir a una velocidad de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$. La asociación de VHH a proteínas B7H3 se monitoreó durante 120 segundos y se monitoreó la disociación de VHH en amortiguador 1xHBS (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % v/v tensioactivo P20) durante más de 120 segundos.

[0182] Se determinaron K_a y K_d ajustando el sensograma en tiempo real para un modelo de unión 1:1 con el software Biacore Insight Evaluation. Se calcularon las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) a partir de las tasas de cinética de la siguiente forma:

$$K_D(M) = k_d/k_a.$$

[0183] En la Tabla 12 y las Figuras 5A-5B se muestran los parámetros de cinética de unión para las proteínas VHH a la proteína B7H3.

Solución de captura 1	Solución de analitos 1	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
B7H3-4IG	VHH1_C001	9,14E+05	6,77E-03	7,41E-09
B7H3-4IG	VHH1_C002	2,47E+06	9,60E-03	3,89E-09
B7H3-2IG	VHH1_C001	2,87E+06	2,70E-01	9,41E-08
B7H3-2IG	VHH1_C002	2,99E+06	1,29E-01	4,33E-08

Actividad de unión de fragmentos de VHH a B7H3 original

[0184] Para la capacidad de unión de VHH anti-B7H3 a B7H3 en la superficie de células vivas, se sembraron 1×10^6 células H358 o MDA-MB-453 en placas de 96 pocillos. Para generar curvas de respuesta de dosis de VHH, se agregaron proteínas VHH diluidas en serie (0,2 nM a 200 nM) a células y el VHH unido se detectó con anticuerpo iFluor 488 de etiqueta His (Núm. de cat. A01800). La intensidad de fluorescencia media (MFI) de cada población celular se midió con el sistema Satorius iQue3 y se determinaron la EC_{50} y E_{max} de cada VHH con el modelo logístico de cuatro parámetros.

Los resultados se muestran en la Tabla 13 y en las Figuras 6A-6D.

Tabla 13. Facs y MFI de la unión dependiente de la dosis de fragmentos de VHH en B7H3 original.

Anticuerpo	EC_{50} (nM)	MFI
VHH1_C001	6,285	495973
VHH1_C002	77,03	539302

Mapeo de epítomos de los fragmentos de VHH humanizados

[0185] Para evaluar si los dos fragmentos de VHH (VHH1_C001 y VHH1_C002) pueden competir entre sí para unirse a su respectivo epítopo en B7H3, se realizó un ensayo de competencia de unión con

el método tándem usando Octet® RH96. Brevemente, las proteínas 4Ig-B7H3 (Cat: 11188-H02H) se capturaron en los biosensores AHC2 Octet®. Luego, los biosensores se sumergieron en 100 nM de fragmentos de VHH1_C002 durante 180 s. Después, los biosensores se sumergieron en 100 nM de solución de mezcla de VHH1_C002 y 100 nM de VHH1_C001. Se evaluó VHH1_C001 o VHH1_C002 solos como grupos de control. Los resultados se muestran en la Figura 7. Los resultados indican que los epítomos de VHH1_C001 y VHH1_C002 compiten parcialmente.

Tabla 14. Secuencias de aminoácidos y ADN de las variantes humanizadas de BGA-056.

<u>Anticuerpo</u>	<u>SEQ ID NO</u>		<u>SECUENCIA</u>
<u>BGA-056</u>	SEQ ID NO: 12	CDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	CDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	CDR3 (Kabat)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 15	VHH AA	EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD YHMSWVRQAPGKGLEWVSGILNTGLSPTYA ATVTGRFTISRDNKNTLYLSMNSLPEDTA VYYCAQGYRATPSQANRGQGTQVTVSS
	SEQ ID NO: 122	VHH ADN	GAGGTGCAACTGCTGGAGTCCGGCGGGGGG CCTGGTGCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCA GCGACTACCACATGAGCTGGGTGAGACAA GCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG CGGCATCCTGAACACCGGCCTGAGCCCCA CCTACGCCGCCACCGTGACCGGCAGATTCA CCATCAGCAGAGATAACGCCAAAAACACC CTGTACCTGAGCATGAACAGCCTGAAGCCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCA AGGCTACTACAGAGCCACCCCTAGCCAAG CCAACAGAGGCCAAGGCACCCAAGTGACC GTGAGCAGC

BGA-174	SEQ ID NO: 12	CDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	CDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	CDR3 (Kabat)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 52	VHH AA	EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGFTFSD YHMSWVRQAPGKGLEWVSGILNTGLSPTYA ATVTGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTA VYYCAQGYRATPSQANRGQGTLVTVSS
	SEQ ID NO: 53	VHH ADN	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGGGGG GCTCGTGCAGCCCGGGGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCA GCGACTACCACATGAGCTGGGTGAGACAA GCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG CGGCATCCTGAACACCGGCCTGAGCCCCA CCTACGCCGCCACCGTGACCGGCAGATTC ACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC CAAGGCTACTACAGAGCCACCCCTAGCCA AGCCAACAGAGGCCAAGGCACCCTGGTGA CCGTGAGCAGC
BGA-1741	SEQ ID NO: 12	CDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	CDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	CDR3 (Kabat)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 54	VHH AA	EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGFTFSD YHMSWVRQAPGKGLEWVSGILNTGLSPTYA

			ATVTGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKGYRATPSQANRGQGLVTVSS
	SEQ ID NO: 55	VHH ADN	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGGGGG GCTCGTGCAGCCCGGGGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCA GCGACTACCACATGAGCTGGGTGAGACAA GCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG CGGCATCCTGAACACCGGCCTGAGCCCCA CCTACGCCGCCACCGTGACCGGCAGATTC ACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AAGGGCTACTACAGAGCCACCCCTAGCCA AGCCAACAGAGGCCAAGGCACCCTGGTGA CCGTGAGCAGC
BGA-1742	SEQ ID NO: 12	CDR1 (Kabat)	DYHMS
	SEQ ID NO: 13	CDR2 (Kabat)	GILNTGLSPTYAATVTG
	SEQ ID NO: 14	CDR3 (Kabat)	GYRATPSQAN
	SEQ ID NO: 56	VHH AA	EVQLLES GGLVQP GGLRLSCAASGFTFSD YHMSWVRQAPGKGLEWVSGILNTGLSPTYA ATVTGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAQGYRATPSQANWGQGLVTVSS
	SEQ ID NO: 57	VHH ADN	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGGGGGGGG GCTCGTGCAGCCCGGGGGCAGCCTGAGAC TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCA GCGACTACCACATGAGCTGGGTGAGACAA GCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG

			CGGCATCCTGAACACCGGCCTGAGCCCCA CCTACGCCGCCACCGTGACCGGCAGATTC ACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC CAAGGCTACTACAGAGCCACCCCTAGCCA AGCCA ACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGA CCGTGAGCAGC
--	--	--	---