

## **DOMINIOS DE UNIÓN AL ANTÍGENO CD3 OPTIMIZADO**

### ***Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas***

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU.  
5   núm. 63/495.127 presentada el 10 de abril de 2023, la cual se incorpora en la presente  
como referencia en su totalidad.

### ***Referencia al Listado de Secuencias Presentado Electrónicamente***

El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente (Nombre: IOTS-102-WO  
10   Sequence Listing.xml; Tamaño: 109.086 bytes; y Fecha de creación: 29 de marzo de 2024)  
presentado con la solicitud, se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

### ***Campo de la Descripción***

La presente descripción se relaciona con anticuerpos o fragmentos de estos que  
15   comprenden un dominio de unión al antígeno capaz de unirse a una proteína CD3 o un  
fragmento de esta. La descripción también se relaciona con métodos para producir estos  
anticuerpos y sus usos terapéuticos.

### ***Antecedentes***

20   Las células T reconocen péptidos antigénicos a través de un complejo de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del  
receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) heterodiméricas, en combinación con  
cuatro subunidades CD3, denotadas  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  (Kindt et al., 2007). Después del reconocimiento  
del antígeno mediado por TCR, CD3 es esencial para transmitir la señalización  
desencadenada por TCR a través de motivos de activación de tirosina inmunorreceptores  
25   (ITAM, por sus siglas en inglés) (Letourneur et al., 1992). Sigue existiendo la necesidad de

más anticuerpos, en particular anticuerpos multiespecíficos, que sean capaces de unirse a CD3 y transmitir la señalización desencadenada por TCR de manera segura y efectiva.

### ***Breve Descripción de la Invención***

- 5 En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de anticuerpos que se unan a CD3 que tengan afinidad optimizada para inducir la activación de las células T, pero sin estar asociados con una liberación excesiva de citocina y una tolerabilidad reducida. La presente descripción implicó un extenso programa de selección y maduración por afinidad para aislar un panel de anticuerpos CD3 que son capaces de unirse a CD3 e inducir la activación de las células T. Se
- 10 espera que tales moléculas sean capaces de lograr un beneficio terapéutico al asegurar un compromiso efectivo de células T, pero sin las preocupaciones de seguridad atribuidas a los anticuerpos que se unen a CD3 con un perfil de liberación de citocina o de alta afinidad, haciéndolos adecuados para el tratamiento del cáncer como agentes inmunoterapéuticos.
- 15 En consecuencia, en un aspecto se proporciona en la presente un anticuerpo que comprende un dominio de unión al antígeno que es capaz de unirse a una proteína CD3 o un fragmento de esta, en donde el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) de acuerdo con una cualquiera de las siguientes:
- 20 una región VH que comprende las siguientes CDR:
- HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 90;
- HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 91; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 92,

una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 82;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 83; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 84,

una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 78;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 79; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 80,

una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 66;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 67; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 68,

una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 70;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 71; y

5 HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 72,

una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 74;

10 HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 75; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 76,

una región VH que comprende las siguientes CDR:

15 HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 86;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 87; y

20 HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 88,

una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 94;

25 HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 95; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 96, y

una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 98;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 99; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 100,

y en donde el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con una cualquiera de las siguientes:

una región VL que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 46;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 47; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 48,

una región VL que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 58;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 59; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 60, y

una región VL que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 62;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 63; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 64.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH y una

región VL que comprende uno de los siguientes conjuntos de las CDR:

i. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 90,

ii. HDCR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 91,

iii. HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 92,

iv. LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 46,

v. LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 47

vi. LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 48; o

i. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 82,

- 5
- ii. HDCR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 83,
  - iii. HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 84,
  - iv. LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 46,
  - v. LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 47,
  - vi. LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 48; o
- 10
- 15
- i. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 78
  - ii. HDCR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 79
  - iii. HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 80,
  - iv. LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 62,
- 20
- v. LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 63,
  - vi. LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 64,

En algunos casos, el dominio VH del dominio de unión al antígeno CD3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 77, la sec. con. núm. de ident.: 89, o la sec. con. núm. de ident.: 81. En algunos casos, el dominio

5 VL del dominio de unión al antígeno CD3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 45, o la sec. con. núm. de ident.: 61.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende:

- 10 i. una región VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 77, y una región VL que tenga al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 61;
- 15 ii. una región VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 89, y una región VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 45 o
- 20 iii. una región VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 81, y una región VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 45.

Como se describió anteriormente, los dominios de unión al antígeno CD3 encuentran utilidad particular cuando se usan en el contexto de un anticuerpo multiespecífico que contiene un dominio de unión al antígeno que es capaz de unirse a otra diana. Por ejemplo, los dominios de unión al antígeno CD3 descritos en la presente pueden formar parte de un anticuerpo multiespecífico que es capaz de unirse a CD3 y otra diana, p. ej., un antígeno asociado a tumores (TAA, por sus siglas en inglés). En la presente se describen ejemplos de los TAA adecuados.

En consecuencia, en algunos casos el anticuerpo comprende además un dominio de unión al antígeno diana. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno diana es capaz de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA). En algunos casos, el anticuerpo está en un formato '2+1', donde el anticuerpo contiene un único dominio de unión al antígeno CD3 que se une a CD3 monovalentemente y dos dominios de unión al antígeno diana que se unen a la diana (p. ej., TAA) bivalentemente. En algunos casos, el anticuerpo está en un formato trispecífico, trivalente, que contiene tres dominios de unión al antígeno.

Cuando se trata de generar anticuerpos multiespecíficos que contienen múltiples brazos de unión al antígeno formados a partir de diferentes cadenas ligeras y pesadas, el emparejamiento promiscuo de cadenas pesadas y ligeras puede presentar desafíos. Como se describe en la presente, se identificaron residuos de aminoácidos en la interfaz entre una cadena ligera lambda y una cadena pesada donde podrían introducirse pares de carga, lo que demuestra que la introducción de estos pares de carga lambda podría mejorar ventajosamente el emparejamiento de cadenas más allá de lo logrado en un formato de anticuerpo anterior. Como se describe adicionalmente en la presente, estas variantes de carga pueden usarse para producir eficientemente anticuerpos multiespecíficos en diferentes formatos, que incluye un formato biespecífico '2+1' y un formato trispecífico trivalente.

En consecuencia, un dominio de unión al antígeno en el anticuerpo (p. ej., el brazo de unión al antígeno CD3) contiene un par de carga lambda entre la región lambda de cadena ligera constante (CL $\lambda$ , por sus siglas en inglés) y la región constante de cadena pesada 1 (CH1, por sus siglas en inglés) de ese brazo de unión al antígeno, en donde el dominio de unión al antígeno comprende un par de carga lambda ubicado en uno o más de los siguientes pares de posiciones:

- (i) posición 117 en la CL $\lambda$  y posición 141 en la CH1;
- (ii) posición 117 en la CL $\lambda$  y posición 185 en la CH1;
- (iii) posición 119 en la CL $\lambda$  y posición 128 en la CH1;
- (iv) posición 134 en la CL $\lambda$  y posición 128 en la CH1;
- (v) posición 134 en la CL $\lambda$  y posición 145 en la CH1;
- (vi) posición 134 en la CL $\lambda$  y posición 183 en la CH1;
- (vii) posición 136 en la CL $\lambda$  y posición 185 en la CH1;
- (viii) posición 178 en la CL $\lambda$  y posición 173 en la CH1; y
- (ix) posición 117 en la CL $\lambda$  y posición 187 en la CH1,

en donde el par de carga lambda comprende un residuo de aminoácido cargado positivamente opcionalmente seleccionado de arginina, lisina o histidina ubicado en una de las posiciones en el par de carga lambda y un residuo de aminoácido cargado negativamente opcionalmente seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico, serina o treonina ubicado en la otra posición en el par de carga lambda, y

en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU.

En algunos casos, un brazo de unión al antígeno en el anticuerpo (p. ej., el brazo de unión al antígeno CD3) contiene un par de carga lambda ubicado en la posición 117 en la CL $\lambda$  y la posición 141 en la CH1, en donde el par de carga lambda comprende un residuo de aminoácido cargado positivamente seleccionado de arginina, lisina o histidina

localizada en una de las posiciones en el par de carga lambda y un residuo de aminoácido cargado negativamente seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico, serina o treonina ubicados en la otra posición en el par de carga lambda.

Como se describe adicionalmente en la presente, los pares de carga lambda pueden

5 combinarse con otros enfoques para fomentar el emparejamiento de cadenas ligeras, por ejemplo para aumentar aún más el ensamblaje correcto del anticuerpo multiespecífico deseado.

En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno CD3 y un dominio de unión al antígeno CD8. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender un dominio

10 de unión al antígeno CD3, un dominio de unión al antígeno TAA y un dominio de unión al antígeno CD8. El dominio de unión al antígeno CD8 puede ser una molécula de VHH (p. ej., fusionada al formato biespecífico 2+1 descrito en la presente). El dominio de unión al antígeno CD8 puede ser un brazo de unión al antígeno ('Fab') (p. ej., uno de los brazos de unión al antígeno en el formato de anticuerpo triespecífico descrito en la presente).

15 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo descrito en la presente, como se define adicionalmente en la presente. También se proporcionan moléculas de anticuerpo y composiciones farmacéuticas, todas como se definen en la presente, para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento de un cáncer. También se proporcionan

20 métodos para tratar el cáncer que comprenden administrar un anticuerpo o composición farmacéutica como se define en la presente.

También se proporcionan ácidos nucleicos, vectores y células huésped como se definen en la presente. También se proporciona un método para producir un anticuerpo como se define en la presente. La descripción incluye la combinación de los aspectos y características descritos

25 excepto cuando tal una combinación sea claramente inadmisibles o se evite expresamente.

### **Sumario de las Figuras**

A continuación se analizarán casos y experimentos que ilustran los principios de la descripción con referencia a las figuras adjuntas en las que:

- 5 La **Figura 1** muestra AZ V $\kappa$  + AZ V $\lambda$  IgG1-TM parental, **(A)** muestra la unión del anticuerpo parental AZ V $\kappa$  + AZ IgG1-TM a células HPB-ALL, que expresan CD3 humano (hCD3<sup>+</sup>, por sus siglas en inglés). **(B)** muestra la unión del anticuerpo parental anti-CD3 AZ V $\kappa$  + AZ IgG1-TM a células HSC-F, que expresan CD3 de mono cynomolgus (cyCD3<sup>+</sup>, por sus siglas en inglés). **(C)** muestra la unión del anticuerpo parental anti-CD3 AZ V $\kappa$  + AZ IgG1-TM a células
- 10 Jurkat hCD3<sup>+</sup>. **(D)** muestra la unión del anticuerpo parental anti-CD3 AZ V $\kappa$  + AZ IgG1-TM a células Jurkat inactivas (KO, por sus siglas en inglés) del receptor de células T (TCR).

- La **Figura 2** muestra la unión de variantes resultantes de la mitigación de posibles riesgos de secuencia dentro de CDR L1-2 y CDR H1-2 a células CD3<sup>+</sup> medida por
- 15 citometría de flujo. **(A)** muestra la unión del anticuerpo parental anti-CD3 y variantes a células HPB-ALL, que expresan CD3 humano (hCD3<sup>+</sup>). **(B)** muestra la unión del anticuerpo parental anti-CD3 y variantes AZ a células HSC-F, que expresan CD3 de mono cynomolgus (cyCD3<sup>+</sup>). **(C)** muestra la unión del anticuerpo parental anti-CD3 y variantes a células Jurkat hCD3<sup>+</sup>. **(D)** muestra la unión del anticuerpo parental anti-CD3
- 20 y las variantes AZ a células Jurkat inactivas (KO) del receptor de células T (TCR).

La **Figura 3** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la unión celular a CD3<sup>+</sup>. La unión a células **(A)** HPB-ALL (hCD3<sup>+</sup>) y **(B)** HSC-F (cyCD3<sup>+</sup>) se midió por citometría de flujo.

La **Figura 4** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la toxicidad celular EGFR+. Los perfiles de citotoxicidad de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron por citometría de flujo después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

La **Figura 5** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la activación de las células T CD4+. Los perfiles de activación de las células T CD4<sup>+</sup> de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron por citometría de flujo después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

La **Figura 6** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la activación de las células T CD8+. Los perfiles de activación de las células T CD8<sup>+</sup> de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron por citometría de flujo después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

La **Figura 7** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de IL-6. Los perfiles de liberación de citocina IL-6 de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se

evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

5

La **Figura 8** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de TNF-α. Los perfiles de liberación de citocina TNF-α de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

10

La **Figura 9** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de IFN-γ. Los perfiles de liberación de citocina IFN-γ de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

15

La **Figura 10** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de IL-2. Los perfiles de liberación de citocina IL-2 de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental

20

anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

La **Figura 11** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de IL-10. Los perfiles de liberación de citocina IL-10 de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

10

La **Figura 12** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de FasL. Los perfiles de liberación de citocina FasL de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

15

La **Figura 13** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de Granzima A. Los perfiles de liberación de citocina Granzima A de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

20

La **Figura 14** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de Granzima B. Los perfiles de liberación de citocina Granzima B de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

La **Figura 15** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de IL-17A. Los perfiles de liberación de citocina IL-17A de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

La **Figura 16** muestra los resultados del perfilado de variantes anti-CD3 para la liberación de Perforina. Los perfiles de liberación de citocina Perforina de los anticuerpos variantes EGFR-CD3 se evaluaron usando el inmunoensayo multiplex ProcartaPlex después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> NCI H358. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en círculos negros rellenos. Los datos que representan las variantes basadas en AZ Vκ 17, 26 y 29 se muestran en gris oscuro, medio y claro, respectivamente.

La **Figura 17** muestra la citotoxicidad dependiente de EGFR<sup>+</sup> y la activación de las células T para variantes anti-CD3 seleccionadas. Se evaluaron los perfiles de citotoxicidad (**A**), activación de las células T CD4<sup>+</sup> (**B**) y activación de las células T CD8<sup>+</sup> (**C**) de anticuerpos variantes EGFR-CD3 seleccionados por citometría de flujo después de la exposición de 24 horas de células T con EGFR<sup>+</sup> MDA-MB-468. Los resultados muestran respuestas dependientes de EGFR.

La **Figura 18** muestra que las variantes anti-CD3 exhiben activación reducida de las células T en comparación con el anti-CD3 parental en ausencia de células EGFR<sup>+</sup>. Los perfiles de activación de las células T CD4<sup>+</sup> (**A**) y CD8<sup>+</sup> (**B**) se evaluaron por citometría de flujo después de la exposición de 48 horas a anticuerpos variantes EGFR-CD3 inmovilizados. Los datos que representan la variante parental anti-CD3 aparecen en barras negras rellenas. Los datos que representan las variantes basadas en AZ V $\kappa$  17, 26 y 29 se muestran en barras grises oscuras, medias y claras, respectivamente.

La **Figura 19** muestra las mediciones cinéticas de las variantes anti-CD3. La medición cinética de la forma soluble de CD3 se obtuvo usando un instrumento Octet384. Las constantes de disociación, KD, se calcularon como una relación de  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  a partir de un ajuste no lineal de los datos.

La **Figura 20** contiene un esquema de los anticuerpos DuetMab que contienen pares de carga. El “ojal” HC de la mano izquierda está unido por disulfuro mediante cisteínas nativas a una LC kappa y contiene un par de carga kappa (p. ej., S183K/V133E), indicado por el símbolo menos (“-”) en la LC kappa y el símbolo más (“+”) en el “ojal” HC. El “botón” HC de la mano derecha está unido por disulfuro a través de cisteínas diseñadas

por ingeniería genética a la LC lambda y contiene un par de carga lambda, indicado por el símbolo más (“+”) en la LC lambda y el símbolo menos (“- ”) en el “botón” HC.

La **Figura 21** contiene un esquema de los anticuerpos DuetMab ‘2+1’ que contienen  
 5 pares de carga. El “botón” HC de la mano derecha está unido por disulfuro a través de  
 cisteínas diseñadas por ingeniería genética a la LC lambda y contiene un par de carga  
 lambda, indicado por el símbolo más (“+”) en la LC lambda y el símbolo menos (“- ”) en  
 el “botón” HC. La región CH1 y VH de este botón HC y la LC lambda forman un “brazo  
 de unión al antígeno CD3”. El “ojal” HC de la mano izquierda está unido por disulfuro  
 10 mediante cisteínas nativas a una LC kappa y contiene un par de carga kappa (p. ej.,  
 S183K/V133E), indicado por el símbolo menos (“-”) en la LC kappa y el símbolo más  
 (“+”) en el “ojal” HC. Un tercer brazo de unión al antígeno está fusionado desde el N-  
 terminal de su CH1 al C-terminal del “botón” HC mediante un enlazador peptídico. La  
 CH1 del tercer brazo de unión al antígeno está unido por disulfuro a través de cisteínas  
 15 nativas a una LC kappa y contiene un par de carga kappa. Como lo indica el sombreado  
 diferente, el primer brazo de unión al antígeno se une a un primer epítipo (CD3) y el  
 segundo y tercer brazo de unión se unen a un segundo epítipo diferente.

La **Figura 22** contiene un esquema de los anticuerpos trispecíficos 'TriMab' que contienen  
 20 pares de carga. El “botón” HC de la mano derecha está unido por disulfuro a través de  
 cisteínas diseñadas por ingeniería genética a la LC lambda y contiene un par de carga  
 lambda, indicado por el símbolo más (“+”) en la LC lambda y el símbolo menos (“- ”) en el  
 “botón” HC. La región CH1 y VH de este botón HC y la LC lambda forman un “primer brazo  
 de unión al antígeno”. El “ojal” HC de la mano izquierda está unido por disulfuro mediante  
 25 cisteínas nativas a una LC kappa y contiene un par de carga kappa, indicado por el símbolo

menos (“-”) en la LC kappa y el símbolo más (“+”) en el “ojal” HC. La región CH1 y VH de este “ojal” HC y kappa LC forman un “segundo brazo de unión al antígeno”. Un tercer brazo de unión al antígeno está fusionado desde el N-terminal de su CH1 al C-terminal del “botón” HC mediante un enlazador peptídico. La CH1 del tercer brazo de unión al antígeno está unido  
5 por disulfuro a través de cisteínas diseñadas por ingeniería genética a una LC kappa y contiene un par de carga kappa, con las cargas opuestas al segundo brazo de unión al antígeno, un residuo de aminoácido cargado negativamente (“-”) en CH1 y un residuo de aminoácido cargado positivamente (“+”) en la LC kappa. Como lo indica el sombreado diferente, el primer brazo de unión al antígeno (sombreado oscuro) se une a un primer  
10 epítipo, el segundo brazo de unión al antígeno (sombreado claro) se une a un segundo epítipo y el tercer brazo de unión (sombreado en rayas) se une a un tercer epítipo.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

A continuación se analizarán en la presente descripción aspectos y casos con referencia a las figuras adjuntas. Otros aspectos y casos serán evidentes para los expertos en la técnica. Todos los documentos mencionados en este texto se incorporan en la presente  
5 como referencia.

Anticuerpos

La presente descripción se relaciona con anticuerpos. Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden proporcionarse en forma aislada, en el sentido de estar  
10 libres de contaminantes, tales como anticuerpos capaces de unirse a otros polipéptidos y/o componentes séricos.

El término “anticuerpo” o “molécula de anticuerpo” describe una inmunoglobulina, ya sea natural o parcial o totalmente producida sintéticamente. El anticuerpo puede ser humano o humanizado. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15 Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina, tales como inmunoglobulina G (IgG, por sus siglas en inglés), y sus subclases isotípicas, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como fragmentos de estos.

El término “anticuerpo”, como se usa en la presente, incluye anticuerpos

multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo. Un anticuerpo multiespecífico es un

20 anticuerpo que comprende al menos dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales es capaz de unirse a una diana diferente. “Fragmentos de anticuerpo” se refiere a una porción del anticuerpo de longitud completa siempre que muestren unión a la(s) molécula(s) diana relevante(s). Típicamente, un fragmento de anticuerpo contendrá la unión al antígeno o región variable de este.

Un anticuerpo se compone típicamente de dos tipos diferentes de cadenas polipeptídicas: una se denomina cadena pesada y la otra se denomina cadena ligera. Un anticuerpo monoespecífico natural consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Las dos cadenas pesadas están típicamente unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está típicamente unida a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Los enlaces disulfuro que unen las cadenas ligera y pesada a veces se denominan enlaces disulfuro “intercadena”, para distinguirlos de los enlaces disulfuro “intracadena” que están presentes dentro de los polipéptidos individuales de cadena pesada y ligera.

La formación de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína ocurre durante el plegamiento de muchas proteínas que entran en la vía secretora. A medida que la cadena polipeptídica colapsa, las cisteínas traídas en proximidad pueden formar enlaces covalentes durante un proceso catalizado por miembros de la familia de la proteína disulfuro isomerasa. El término “enlace disulfuro” o “disulfuro enlazado” como se usa en la presente, se refiere al enlace covalente único formado a partir del acoplamiento de grupos tiol, especialmente de residuos de cisteína. En algunos aspectos, el enlace covalente entre dos cisteínas es entre los dos átomos de azufre de cada residuo. Sin embargo, dependiendo del ambiente, no todas las especies de proteínas pueden tener un disulfuro presente en todo momento, por ejemplo, en caso de reducción de disulfuro. Por lo tanto, el término “enlace disulfuro” o “disulfuro enlazado” (ya sea nativo o diseñado por ingeniería genética), en algunos aspectos, también se refiere a la presencia de dos residuos de cisteína que son capaces de formar un enlace disulfuro, independientemente de si están realmente enlazados o no en ese punto individual en el tiempo.

Todas las cadenas ligeras de los anticuerpos naturales son cadenas ligeras “lambda  $\lambda$ ” o “kappa  $\kappa$ ”, que difieren en términos de su secuencia de aminoácidos. Las cadenas ligeras están compuestas por una única región de cadena ligera constante (CL, por sus

siglas en inglés) y una única región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés). Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de la región lambda de cadena ligera constante (CL $\lambda$ , por sus siglas en inglés) se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 105 y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de la región kappa de cadena ligera (CL $\kappa$ , por sus siglas en inglés) se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 106. Las cadenas ligeras usadas en los anticuerpos descritos en la presente pueden ser cadenas ligeras quiméricas, *p. ej.*, contener una CL $\lambda$  y una VL $\kappa$ .

Las cadenas pesadas IgG están compuestas por una región variable pesada (VH) y tres regiones constantes pesadas (CH1, CH2 y CH3), con una “región bisagra” adicional entre CH1 y CH2. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de la región CH1 de IgG1 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 101. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de CH2 de IgG1 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 102. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de CH3 de IgG1 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 103. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende una CH1, bisagra, CH2 y CH3 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 104.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, las posiciones de los residuos de aminoácidos en el dominio constante, que incluye la posición de las secuencias de aminoácidos, sustituciones, deleciones e inserciones como se describe en la presente, se enumeran de acuerdo con la numeración de EU (Edelman, 2007).

La cadena ligera se asocia con la VH y CH1 para formar un “brazo de unión al antígeno”, también denominado en la presente “brazo de unión diana” y los dominios variables en el brazo de unión al antígeno interactúan para formar el “dominio de unión al antígeno”.

Un “dominio de unión al antígeno” describe la parte de una molécula que se une a todo o parte del antígeno diana y generalmente comprende seis regiones determinantes de la

complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés); tres en la región VH: HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y tres en la región VL: LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las seis CDR juntas definen el parátipo del dominio de unión al antígeno, que es la parte del dominio de unión al antígeno que se une al antígeno diana.

- 5 La región VH y la región VL comprenden regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) a ambos lados de cada CDR, que proporcionan un andamio para las CDR. Desde el N-terminal hasta el C-terminal, las regiones VH comprenden la siguiente estructura: N term-[HFR1]-[HCDR1]-[HFR2]-[HCDR2]-[HFR3]-[HCDR3]-[HFR4]-C term; y las regiones VL comprenden la siguiente estructura: N term-[LFR1]-[LCDR1]-[LFR2]-[LCDR2]-[LFR3]-[LCDR3]-[LFR4]-C term.

- 10 Típicamente, el dominio de unión al antígeno comprende la región VH y VL.

Un “brazo de unión al antígeno” como se describe en la presente comprende el dominio de unión al antígeno (p. ej., la región VH y VL) y también una CH1 y una cadena ligera constante (es decir, al menos un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera), donde la cadena ligera constante es disulfuro enlazado a CH1.

- 15 Una molécula de anticuerpo IgG monoespecífica monoclonal contiene dos brazos de unión al antígeno, cada uno de los cuales es capaz de unirse a la misma diana (es decir, es bivalente para una sola diana).

Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd y Fv.

- 20 Diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos formados a partir de estos fragmentos de anticuerpo.

Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante una digestión proteolítica de anticuerpos intactos usando técnicas conocidas en la técnica. Sin embargo, ahora estos fragmentos pueden ser producidos directamente por células huésped recombinantes.

- 25 Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y segregarse a partir de E. coli, permitiendo por lo tanto la producción fácil de grandes cantidades de

estos fragmentos. En un aspecto, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas en otra parte de la presente. Los fragmentos Fab'-SH también pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> también pueden

5 aislarse directamente del cultivo de célula huésped recombinante. En la técnica se conocen otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. En ciertos aspectos, los anticuerpos proporcionados en la presente comprenden un fragmento Fv monocatenario (scFv, por sus siglas en inglés) u otro dominio de unión al antígeno. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo descritos en la presente comprenden

10 anticuerpos de dominio, p. ej., anticuerpos que contienen las pequeñas unidades de unión funcional de anticuerpos correspondientes a la región portable de las cadenas VH y VL de anticuerpos humanos.

### *Dominio de unión al antígeno CD3*

15 La presente descripción proporciona anticuerpos que comprenden un dominio de unión al antígeno que es capaz de unirse a una proteína CD3 o un fragmento de esta. Tales dominios de unión al antígeno también se denominan en la presente “dominios de unión al antígeno CD3”. En algunos casos, los anticuerpos que comprenden los dominios de unión al antígeno se unen a CD3 monovalentemente (p. ej., el anticuerpo solo contiene

20 un único dominio de unión al antígeno CD3).

CD3 (grupo de diferenciación 3) es un complejo proteico compuesto por cuatro subunidades, la cadena CD3γ, la cadena CD3δ y dos cadenas CD3ε. CD3 se asocia con el receptor de células T y la cadena ζ para generar una señal de activación en los linfocitos T. El dominio de unión al antígeno CD3 comprende las CDR de un anticuerpo que es capaz

25 de unirse a CD3. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una

región VH y/o una región VL que es, o tiene al menos 70 % de identidad con, la región VH y/o VL de un anticuerpo que se une a CD3 como se ejemplifica en la presente.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH de acuerdo con una cualquiera de (1) a (9) a continuación:

- 5 Un anticuerpo que comprende un dominio de unión al antígeno que es capaz de unirse a una proteína CD3 o un fragmento de esta, en donde el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con una cualquiera de las siguientes:

(1) una región VH que comprende las siguientes CDR:

10 HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 90;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 91; y

15 HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 92,

(2) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 82;

20 HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 83; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 84,

(3) una región VH que comprende las siguientes CDR:

25 HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 78;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 79; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 80,

5 (4) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 66;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 67; y

10 HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 68,

(5) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 70;

15 HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 71; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 72,

(6) una región VH que comprende las siguientes CDR:

20 HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 74;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 75; y

25 HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 76,

(7) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 86;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 87; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 88,

(8) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 94;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 95; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 96, y

(9) una región VH que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 98;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 99; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 100,

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VL de acuerdo con una cualquiera de (1) a (3) a continuación:

(10) una región VL que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 46;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 47; y

5 HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 48,

(11) una región VL que comprende las siguientes CDR:

HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 58;

10 HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 59; y

HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 60, y

(12) una región VL que comprende las siguientes CDR:

15 HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 62;

HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 63; y

20 HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 64.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH de acuerdo con una cualquiera de (1) a (9) y una región VL de acuerdo con una cualquiera de (10) a (12) anteriores. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno CD3 puede comprender:

25 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (1) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (2) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (3) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

5 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (4) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (5) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

10 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (6) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (7) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (8) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

15 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (9) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (1) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

20 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (2) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (3) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (4) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (5) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (6) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

5 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (7) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (8) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

10 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (9) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (1) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (2) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

15 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (3) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (4) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

20 una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (5) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (6) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (7) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (8) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12); o

una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (9) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12).

- 5 En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 no comprende una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (1) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12).

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende:

- 10 (13) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (3) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12);

(14) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (1) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10); o

(15) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (2) y una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10).

15

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH de acuerdo con una cualquiera de (16) a (24) a continuación:

- 20 (16) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (1) y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 89;

- (17) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (2) y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 90;
- 25

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 81;

(18) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (3) y que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 5

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 77;

(19) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (4) y que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 10

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 65;

(20) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (5) y que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 15

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 69;

(21) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (6) y que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 20

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 73;

(22) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (7) y que

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 25

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 85;

(23) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (8) y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 5

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 93; y

(24) una región VH que comprende las CDR de acuerdo con (9) y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 10

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 97.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VL de

15 acuerdo con una cualquiera de (25) a (27) a continuación:

(25) una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (10) y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de

20 secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 45;

(26) una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (11) y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de

25 secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 57; y

(27) una región VL que comprende las CDR de acuerdo con (12) y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 61;

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH de acuerdo con una cualquiera de (16) a (24) y una región VL de acuerdo con una cualquiera de (25) a (27) anteriores. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno CD3 puede comprender:

- 10 una región VH de acuerdo con (16) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (17) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (18) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (19) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (20) y una región VL de acuerdo con (25);
- 15 una región VH de acuerdo con (21) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (22) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (23) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (24) y una región VL de acuerdo con (25);
- una región VH de acuerdo con (16) y una región VL de acuerdo con (26);
- 20 una región VH de acuerdo con (17) y una región VL de acuerdo con (26);
- una región VH de acuerdo con (18) y una región VL de acuerdo con (26);
- una región VH de acuerdo con (19) y una región VL de acuerdo con (26);
- una región VH de acuerdo con (20) y una región VL de acuerdo con (26);
- una región VH de acuerdo con (21) y una región VL de acuerdo con (26);
- 25 una región VH de acuerdo con (22) y una región VL de acuerdo con (26);

- una región VH de acuerdo con (23) y una región VL de acuerdo con (26);
- una región VH de acuerdo con (24) y una región VL de acuerdo con (26);
- una región VH de acuerdo con (16) y una región VL de acuerdo con (27);
- una región VH de acuerdo con (17) y una región VL de acuerdo con (27);
- 5 una región VH de acuerdo con (18) y una región VL de acuerdo con (27);
- una región VH de acuerdo con (19) y una región VL de acuerdo con (27);
- una región VH de acuerdo con (20) y una región VL de acuerdo con (27);
- una región VH de acuerdo con (21) y una región VL de acuerdo con (27);
- una región VH de acuerdo con (22) y una región VL de acuerdo con (27);
- 10 una región VH de acuerdo con (23) y una región VL de acuerdo con (27); o
- una región VH de acuerdo con (24) y una región VL de acuerdo con (27).

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 no comprende una región VH de acuerdo con (16) y una región VL de acuerdo con (27).

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende:

- 15 (28) una región VH de acuerdo con (18) y una región VL de acuerdo con (27);
- (29) una región VH de acuerdo con (16) y una región VL de acuerdo con (25); o
- (30) una región VH de acuerdo con (17) y una región VL de acuerdo con (25).

Los anticuerpos descritos en la presente pueden exhibir toxicidad reducida debido a una

20 menor afinidad de unión mientras mantienen la activación de las células T, asegurando por lo tanto el involucramiento de las células T. El anticuerpo descrito en la presente puede caracterizarse por un dominio de unión al antígeno CD3 que tiene una afinidad particular por CD3. La afinidad de unión de una molécula de anticuerpo a un antígeno afín, tal como CD3 humano (p. ej., CD3 $\epsilon\delta$  humano recombinante, tal como el disponible de Acro

25 Biosystems, CDD-H82W6) puede determinarse mediante resonancia de plasmón

superficial (SPR, por sus siglas en inglés), usando análisis de Octet o Biacore, por ejemplo. La afinidad de unión se puede determinar usando un anticuerpo, por ejemplo como parte de una molécula de anticuerpo multiespecífico que comprende el dominio de unión al antígeno CD3 y otro dominio de unión al antígeno. Alternativamente, la afinidad de unión puede determinarse usando un anticuerpo que sea monoespecífico para CD3.

La afinidad de unión se mide típicamente por  $K_d$  (la constante de disociación de equilibrio entre el dominio de unión al antígeno y su antígeno). Como bien se entiende, cuanto menor sea el valor  $K_d$ , mayor será la afinidad de unión del dominio de unión al antígeno.

Por ejemplo, se consideraría que un dominio de unión al antígeno que se une a una

diana con una  $K_d$  de 10 nM se une a dicha diana con una afinidad mayor que un dominio de unión al antígeno que se une a la misma diana con una  $K_d$  de 100 nM.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 se une a CD3 humano con una

afinidad que tiene una  $K_d$  igual o mayor que  $1 \times 10^8$  M, igual o mayor que  $9 \times 10^7$  M, igual o mayor que  $8 \times 10^7$  M. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 se une a CD3

humano con una afinidad que tiene una  $K_d$  entre  $1 \times 10^8$  M y  $1 \times 10^6$ , entre  $9 \times 10^7$  M y  $1 \times 10^6$ , o entre  $8 \times 10^7$  M y  $1 \times 10^6$ . En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 se une a

CD3 humano con una afinidad que tiene una  $K_d$  entre  $1 \times 10^8$  M y  $2 \times 10^6$ , entre  $9 \times 10^7$  M y  $2 \times 10^6$ , o entre  $8 \times 10^7$  M y  $2 \times 10^6$ . Opcionalmente, la  $K_d$  se mide usando resonancia de

plasmón superficial, p. ej., usando análisis de Octet como se describe en los ejemplos.

El dominio de unión al antígeno CD3 puede unirse a CD3 humano con una afinidad que es similar a la de un dominio de unión al antígeno de acuerdo con (28), (29) o (30) como se estableció anteriormente. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno CD3 puede unirse a CD3 humano con una afinidad que tiene una  $K_d$  que es menos de 5 veces diferente, menos de 4 veces diferente, menos de 3 veces diferente, menos de 2 veces

diferente, menos de 1 vez diferente o menos de 0,5 veces diferente de un dominio de unión al antígeno de acuerdo con (28), (29) o (30) como se estableció anteriormente.

El dominio de unión al antígeno CD3 puede clasificarse como capaz de unirse

específicamente a CD3. El término “específico” puede referirse a la situación en la que

5 el dominio de unión al antígeno no mostrará ninguna unión significativa a moléculas

distintas de su(s) socio(s) de unión específico(s), en este caso CD3. Tales moléculas se

denominan “moléculas no diana”. El término “específico” también es aplicable cuando la

molécula de anticuerpo es específica para epítopos particulares, tales como epítopos en

CD3, que son transportados por una serie de antígenos en cuyo caso la molécula de

10 anticuerpo podrá unirse a los diversos antígenos que transportan el epítopo.

En algunos casos, se considera que el dominio de unión al antígeno CD3 no muestra

ninguna unión significativa a una molécula no diana si el grado de unión a una molécula

no diana es menos que aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo a la diana

medida, p. ej., mediante ELISA, SPR, interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en

15 inglés), termoforesis MicroScale (MST, por sus siglas en inglés), o mediante un

radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). Alternativamente, la especificidad de

unión puede reflejarse en términos de afinidad de unión, donde el dominio de unión al

antígeno CD3 descrito en la presente se une a CD3 con una afinidad que es al menos

0,1 orden de magnitud mayor que la afinidad hacia otra molécula no diana. En algunos

20 casos, el dominio de unión al antígeno CD3 descrito en la presente se une a CD3 con

una afinidad que es uno de al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 o 2,0

órdenes de magnitud mayor que la afinidad hacia otra molécula no diana.

El dominio de unión al antígeno CD3 puede clasificarse adicionalmente por su capacidad

para inducir la activación de las células T. Los métodos para medir la activación de las

25 células T son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la activación de las células T

puede evaluarse midiendo la regulación positiva de marcadores de activación, tales como CD69 y/o CD25 en células T CD4+ y/o células T CD8+ usando citometría de flujo. CD69 es un receptor de lectina C tipo II unido a membrana y es un marcador de activación temprana de la activación de las células T debido a su rápida aparición en la superficie de la membrana plasmática después de la activación de las células T (Cibrián et al., 2017). CD25 es componente del receptor de IL-2, importante en la proliferación de células T, y es un marcador de activación tardía, es importante en la proliferación y activación de las células T, y la regulación positiva de CD25 en la superficie celular indica la activación tardía de las células T. Se prevén formas alternativas de medir la activación de las células T, tales como, por ejemplo, medir la proliferación de células T, o medir la producción de citocinas efectoras (p. ej., IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ ) (Zappasodi, et al., 2020).

En consecuencia, la activación de las células T puede medirse calculando el porcentaje de células T CD4+ y/o células T CD8+ que son positivas para CD69 y/o CD25 usando citometría de flujo, como se hizo en los ejemplos. Por ejemplo, un dominio de unión al antígeno que induce la regulación positiva de CD69 y CD25 en 20 % de las células T CD4+ ha disminuido la actividad de las células T en comparación con un dominio de unión al antígeno que induce la regulación positiva de CD69 y CD25 en el 80 % de las células T CD4+, medido por citometría de flujo.

Como se describe en la presente, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a una diana y CD3 tienen como objetivo inducir la activación de las células T solo después del involucramiento tanto de una célula diana (célula no T) como de una célula T. La actividad de las células T fuera de la diana puede ocurrir cuando el anticuerpo multiespecífico induce la activación de las células T sin involucrar a una célula diana. La activación de las células T fuera de la diana se puede medir usando una molécula de anticuerpo multiespecífica que comprende el dominio de unión al antígeno CD3 y otro

dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno diana diferente (p. ej., un dominio de unión al antígeno del antígeno asociado a tumores (TAA)) en un ensayo de activación de las células T en el que las células que expresan el antígeno diana están ausentes.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 descrito en la presente exhibe

5 una actividad reducida de las células T fuera de la diana en comparación con un dominio de unión al antígeno de control que tiene una secuencia de dominio VH mostrada como la sec. con. núm. de ident.: 5 y una secuencia de dominio VL mostrada como la sec. con. núm. de ident.: 1. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 descrito en la presente exhibe una actividad de las células T fuera de la diana que es al menos 2

10 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces menor en comparación con un dominio de unión al antígeno de control que tiene una secuencia de dominio VH mostrada como la sec. con. núm. de ident.: 5 y una secuencia de dominio VL mostrada como la sec. con. núm. de ident.: 1. La activación de las células T fuera de la diana se puede determinar usando el anticuerpo en un ensayo de activación de las células T en ausencia del

15 involucramiento con una célula diana. En algunos casos, la activación de las células T fuera de la diana se determina calculando el porcentaje de células T CD4+ y/o células T CD8+ que son positivas para CD69 y/o CD25 usando citometría de flujo, en ausencia de células diana que expresen un antígeno diana al que el anticuerpo es capaz de unirse.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 descrito en la presente exhibe la

20 actividad de las células T medida por liberación de citocina por células T CD4+ y/o CD8+ después de la unión a CD3, en donde la actividad de las células T se reduce en comparación con un anticuerpo de control anti-CD3 parental. Las citocinas pueden

seleccionarse del grupo que consiste en: IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, FasL, Granzima A,

Granzima B, IL-17A y perforina. Los métodos para medir la liberación de citocinas son muy

25 conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, medir las concentraciones de citocinas en

los sobrenadantes de un cultivo de células T usando un inmunoensayo, tal como ELISA.

Mantener la liberación de citocinas, en particular las citocinas proinflamatorias, bajo control después de la activación de las células T es beneficioso ya que reduce el riesgo del síndrome de liberación de citocinas (CRS, por sus siglas en inglés).

- 5 La hiperactivación de las células inmunitarias, tales como las células T, puede conducir al CRS, que es una afección grave caracterizada por la hipersecreción de citocinas proinflamatorias. En algunos casos, el anticuerpo descrito en la presente, exhibe citotoxicidad reducida en comparación con un anticuerpo de control anti-CD3 parental. Los ensayos para medir la citotoxicidad pueden incluir medir la muerte celular por citometría de
- 10 flujo usando yoduro de propidio (Crowley et al., 2016), o tintes que se unen covalentemente a aminas libres en la superficie y dentro de las células (tal como CellTrace <sup>TM</sup>).

### Anticuerpos multiespecíficos

- Como se señaló anteriormente, los dominios de unión al antígeno CD3 son útiles cuando se
- 15 usan en un formato de anticuerpo multiespecífico. Por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico puede contener un dominio de unión al antígeno CD3 como se describe en la presente y un dominio de unión al antígeno diana capaz de unirse a una diana que no es CD3. El dominio de unión al antígeno diana puede ser capaz de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA). Tales anticuerpos multiespecíficos pueden usarse para la unión simultánea al TAA
- 20 expresado en células cancerosas y CD3 en una célula T, forzando de esta manera una interacción temporal entre la célula diana y la célula T, causando reticulación, activación de las células T y posterior muerte de células T dependientes de antígenos de la célula diana. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno CD3 y un dominio de unión al antígeno diana. En algunos casos, el anticuerpo comprende además
- 25 un dominio de unión al antígeno que es capaz de unirse a un TAA (también denominado

en la presente como dominio de unión al antígeno TAA). El anticuerpo puede ser capaz de unirse a CD3 monovalentemente y el TAA monovalentemente (p. ej., el anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno CD3 y un dominio de unión al antígeno TAA).

Los ejemplos de los TAA incluyen AFP,  $\alpha_5\beta_3$  (receptor de vitronectina),  $\alpha_5\beta_6$ , agente de

5 maduración de células B (BCMA, por sus siglas en inglés), CA125 (MUC16), CD4, CD20, CD22, CD33, CD52, CD56, CD66e, CD80, CD140b, CD227 (MUC1), EGFR (HER1), EpCAM, gangliósido GD3, HER2, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA, por sus siglas en inglés), antígeno específico de la próstata (PSA, por sus siglas en inglés), CD5, CD19, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, HLA-DR, antiidiotipo, 10 antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), p. ej., molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5 (CEACAM5, por sus siglas en inglés), TAG-72, proteína de unión a folato, A33, G250, ferritina, glicolípidos tales como gangliósidos, carbohidratos tales como CA-125, receptor de IL-2, proteína de activación de fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés), IGF1 R, B7H3, B7H4, PD-L1, 15 CD200, EphA2, c-Met y mesotelina o variantes de estos. En algunos aspectos, los TAA incluyen EGFR, HER2, STEAP2, GPC3, y c-Met.

En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno CD3 y un dominio de unión al antígeno CD8. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender un dominio de unión al antígeno CD3, un dominio de unión al antígeno TAA y un dominio de 20 unión al antígeno CD8.

CD8 (grupo de diferenciación 8) es un dímero que consiste en un par de cadenas CD8. La forma más común de CD8 está compuesta por una cadena CD8- $\alpha$  y CD8- $\beta$ . CD8 sirve como el correceptor en las células T restringidas a MCHI y actúa para mejorar la sensibilidad al antígeno de las células T CD8<sup>+</sup> al unirse a una región en gran medida

25 invariante de MHCI en un sitio distinto de donde se une el receptor de células T. Sin desear

estar limitado por la teoría, se cree que incluir un dominio de unión al antígeno que es capaz de unirse a CD8 en el anticuerpo multiespecífico permite la activación preferencial de las células T CD8<sup>+</sup>, lo que puede proporcionar una eficacia terapéutica superior.

En algunos casos, el anticuerpo multiespecífico está en un formato '2+1 '. En el 'formato

5 2+1 'el anticuerpo contiene un dominio de unión al antígeno que se une monovalentemente a un primer epítipo, y dos dominios de unión al antígeno adicionales que se unen a un segundo epítipo bivalentemente, donde el segundo epítipo es diferente al primer epítipo. El formato 2+1 de anticuerpos multiespecíficos es muy adecuado para la unión de CD3, ya que el objetivo es unirse solo monovalentemente a la proteína CD3 de  
10 tal manera que el receptor de células T solo se reticule y se active después de la unión de la célula diana. En consecuencia, en algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio de unión al antígeno CD3 descrito en la presente, y dos dominios de unión al antígeno diana que son capaces de unirse a la misma diana (p. ej., un TAA).

En el formato '2+1', uno de los dos dominios de unión al antígeno diana se fusiona con  
15 cualquiera de los otros dominios de unión al antígeno presentes en el anticuerpo, típicamente a través de un enlazador peptídico. Los enlazadores peptídicos adecuados son conocidos en la técnica y pueden consistir en 5 a 100 aminoácidos, 5 a 50 aminoácidos, 5 a 25 aminoácidos, o 5 a 15 aminoácidos. Los enlazadores peptídicos se forman principalmente a partir de residuos de aminoácidos de glicina y serina y pueden comprender las secuencias de  
20 aminoácidos GGGGS (sec. con. núm. de ident.: 113) o SGGGS (sec. con. núm. de ident.: 114). En un aspecto, el enlazador peptídico comprende o consiste en (GGGGS)<sub>2</sub> (sec. con. núm. de ident.: 115). En algunos casos, uno de los dominios de unión al antígeno diana se fusiona (p. ej., a través de un enlazador peptídico) al dominio de unión al antígeno CD3.

Adicionalmente, en la presente se describen anticuerpos multiespecíficos que  
25 comprenden una región de unión al antígeno CD8, además de los brazos de unión al

antígeno del anticuerpo biespecífico '2+1'. Tales anticuerpos pueden ser un anticuerpo trispecífico, tetravalente: un dominio de unión al antígeno CD3 se une a CD3 monovalentemente, dos dominios de unión al antígeno diana se unen a una diana (p. ej., un TAA) bivalentemente, mientras que el dominio de unión al antígeno CD8 (p. ej., VHH) se une a CD8 monovalentemente.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD8 es un anticuerpo de dominio único, tal como un dominio variable de cadena pesada (VH) que carece de una CH1 y una cadena ligera. El dominio variable de cadena pesada derivado de un anticuerpo de cadena pesada que naturalmente carece de una cadena ligera se denomina VHH en la presente para distinguirlo de la VH convencional de una inmunoglobulina de cuatro cadenas. Esta molécula de VHH puede derivarse de anticuerpos producidos en especies de camélidos tales como camellos, alpacas, dromedarios, llamas y guanaco. Las especies distintas de los camélidos también pueden producir anticuerpos de cadena pesada que naturalmente carecen de una cadena ligera, y tales VHH también están abarcados.

Similar con otros fragmentos de anticuerpos no humanos, la secuencia de aminoácidos del VHH de camélidos se puede alterar recombinantemente para obtener una secuencia que imite más de cerca una secuencia humana, es decir, “humanizada”, reduciendo de esta manera la antigenicidad del VHH de camélidos a los humanos. Además, los elementos clave derivados de los VHH camélidos también pueden transferirse al dominio VH humano para obtener un dominio VH humano camelizado.

El dominio de unión al antígeno CD8 (p. ej., VHH) puede fusionarse con cualquiera de los otros dominios de unión al antígeno presentes en el anticuerpo, típicamente a través de un enlazador peptídico. Los enlazadores peptídicos adecuados son conocidos en la técnica y pueden consistir en 5 a 100 aminoácidos, 5 a 50 aminoácidos, 5 a 25 aminoácidos, o 5 a 15 aminoácidos. Los enlazadores peptídicos se forman principalmente a partir de residuos

de aminoácidos de glicina y serina y pueden comprender las secuencias de aminoácidos GGGGS (sec. con. núm. de ident.: 113) o SGGGS (sec. con. núm. de ident.: 114). En un ejemplo, el enlazador peptídico comprende o consiste en (GGGS)<sub>2</sub> (sec. con. núm. de ident.: 115). En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD8 se fusiona con uno de los dominios de unión al antígeno diana.

En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno CD8 (p. ej., VHH) comprende las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

i HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 109, 116, o 117;

ii. HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 110;

iii. HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 111;

En algunos aspectos, el primer brazo de unión al antígeno comprende una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %, identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 112, 118, 119 o 120.

Las proteínas VHH de la sec. con. núms. de ident.: 118-120 son derivadas de la sec. con. núm. de ident.: 112, las cuales han sido modificadas para eliminar sitios de desamidación, que incluyen la secuencia CDR1 (ver secuencias CDR1 modificadas de la sec. con. núms. de ident.: 116 y 117, que son derivadas de la sec. con. núm. de ident.: 109). Por lo tanto, estos VHH modificados pueden mostrar una estabilidad mejorada en comparación con el VHH original de la sec. con. núm. de ident.: 112.

Adicionalmente se describen en la presente anticuerpos multiespecíficos que son anticuerpos triespecíficos, trivalentes. En este formato, el anticuerpo contiene tres dominios de unión al antígeno que cada uno se une monovalentemente a un epítipo diferente. En

consecuencia, en algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio de unión al antígeno CD3 descrito en la presente, el dominio de unión al antígeno diana (p. ej., TAA) y un tercer dominio de unión al antígeno. El tercer dominio de unión al antígeno puede ser un dominio de unión al antígeno CD8, o puede ser un dominio de unión al antígeno diana (p. ej., TAA) que se une a una diana diferente (p. ej., TAA) al dominio de unión al antígeno diana. En este formato triespecífico, cada dominio de unión al antígeno comprende una cadena ligera, una VH y CH1 (es decir, al menos un dominio constante y uno variable de cada una de la cadena ligera), donde la cadena ligera es disulfuro enlazado a CH1 (es decir, cada dominio de unión al antígeno es un brazo de unión al antígeno).

- 10 En algunos aspectos, uno de los brazos de unión al antígeno de un TriMab antígeno 1/antígeno 2/CD3 es capaz de unirse a un epítipo en el antígeno 1 o antígeno 2 que no induce citotoxicidad celular. En algunos aspectos, el brazo de unión al antígeno 1 de un TriMab antígeno 1/antígeno 2/CD3 inducirá citotoxicidad celular y el brazo de unión al antígeno 2 actuará como un brazo de anclaje sin capacidad para inducir citotoxicidad
- 15 celular en células que expresan solamente el antígeno 2. En algunos aspectos, el brazo de unión al antígeno 2 de un TriMab antígeno 1/antígeno 2/CD3 inducirá citotoxicidad celular y el brazo de unión al antígeno 1 actuará como un brazo de anclaje sin capacidad para inducir citotoxicidad celular en células que expresan solamente el antígeno 1. La incapacidad del brazo de anclaje para inducir la citotoxicidad celular puede deberse, por
- 20 ejemplo, a la unión a un epítipo distal de membrana que impide la capacidad de formar una sinapsis inmunológica activa.

Los pares de carga lambda recientemente identificados podrían usarse junto con pares de carga kappa para producir anticuerpos triespecíficos que contienen tres brazos de unión al antígeno diferentes. En particular, se reconoció que:

- el emparejamiento eficiente de un primer brazo de unión al antígeno podría lograrse usando un par de carga lambda entre la CH1 y la CL $\lambda$  del primer brazo de unión al antígeno (p. ej., el brazo de unión al antígeno CD3 descrito en la presente);
- 5        - el emparejamiento eficiente de un segundo brazo de unión al antígeno podría lograrse usando un par de carga kappa entre la CH1 y la CL $\kappa$  del segundo brazo de unión al antígeno (p. ej., el brazo de unión al antígeno diana descrito en la presente); y
- el emparejamiento eficiente de un tercer brazo de unión al antígeno podría  
10        lograrse usando un par de carga kappa entre la CH1 y la CL $\kappa$  del tercer brazo de unión al antígeno (p. ej., un brazo de unión al antígeno diana CD8, o un dominio de unión al antígeno diana (p. ej., TAA) que se une a una diana diferente al segundo brazo de unión al antígeno), donde los residuos de aminoácidos cargados están en la disposición opuesta a la del segundo  
15        brazo de unión al antígeno.

Tener los pares de carga kappa en la disposición opuesta a la del segundo brazo de unión al antígeno significa que si el par de carga kappa del segundo brazo de unión al antígeno contiene un residuo de aminoácido cargado positivamente en la CH1 y un residuo de aminoácido cargado negativamente en la CL $\kappa$ , entonces el par de carga  
20        kappa del tercer brazo de unión al antígeno contiene un residuo cargado negativamente en la CH1 y un residuo de aminoácido cargado positivamente en la CL $\kappa$ .

### Regiones constantes

Como se describe en la presente, los dominios de unión al antígeno (p. ej., las regiones VH y  
25        VL definidas anteriormente) pueden comprender adicionalmente dominios constantes de una

cadena pesada y ligera. Un dominio de unión al antígeno que comprende además una CH1 y una cadena ligera constante, donde la cadena ligera constante es disulfuro enlazado a la CH1 también se denomina en la presente “brazo de unión al antígeno” o una “región Fab”.

En algunos casos, el anticuerpo descrito en la presente comprende una o más regiones constantes de cadena pesada (CH) de inmunoglobulina. En algunos casos, la CH es, o se deriva de, la secuencia constante de cadena pesada de una IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (p. ej., IgA1, IgA2), IgD, IgE o IgM.

Las cadenas pesadas IgG están compuestas por una región variable pesada (VH) y tres regiones constantes pesadas (CH1, CH2 y CH3), con una “región bisagra” adicional entre CH1 y CH2. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de la región CH1 de IgG1 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 101. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de CH2 de IgG1 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 102. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de CH3 de IgG1 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 103. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende una CH1, bisagra, CH2 y CH3 se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 104.

Cada dominio de unión al antígeno puede comprender además regiones de cadena pesada adicionales, es decir, una o más de CH1, bisagra, CH2 y CH3. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada completa (es decir, una VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3).

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una región CH1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 101.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una región CH2 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 102.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una región CH3 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 103.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una región constante de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 104.

En algunos casos, el anticuerpo descrito en la presente comprende una región constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina o un fragmento de esta. En algunos casos, la región CL comprende una región constante lambda (CL $\lambda$ ), p. ej., que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 105. En algunos casos, la región CL comprende una región constante kappa (CL $\kappa$ ), p. ej., que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia, o al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la sec. con. núm. de ident.: 106.

En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena ligera completa que comprende o consiste en una región VL como se describe en la presente y una región CL como se describe en la presente. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada que contiene la región VL de un dominio de unión al antígeno CD3 descrito en la presente y una región CL como se describe en la presente (p. ej., una región CL $\lambda$  o CL $\kappa$ ). La CH, CL, cadena pesada y/o cadena ligera de los anticuerpos descritos en la presente puede comprender una o más modificaciones, por ejemplo para abrogar o reducir las funciones efectoras de Fc, promover la formación de una molécula de anticuerpo heterodimérico, para aumentar la eficacia del emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras afín, y/o para ayudar con la formación de conjugados como se describe con más detalle a continuación.

### Pares de carga

En algunos casos, un brazo de unión al antígeno (“región Fab”) del anticuerpo descrito en la presente comprende un par de carga, ubicado en una región de cadena ligera (p. ej., región de cadena ligera constante) y el otro en una región de cadena pesada (p. ej., región de cadena pesada constante 1 (CH1)) de un brazo de unión al antígeno, ubicado en posiciones destinadas a promover la asociación de las cadenas ligera y pesada. Por “par de carga lambda”, se entiende un par de carga donde un residuo de aminoácido cargado positiva o negativamente se ubica en una cadena ligera lambda. Por “par de carga kappa”, se entiende un par de carga donde un residuo de aminoácido cargado positiva o negativamente en la cadena ligera se ubica en una cadena ligera kappa. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que los residuos de aminoácidos cargados de manera contraria en el par de carga aumentan la atracción de la cadena pesada hacia

la cadena ligera en un brazo de unión al antígeno, promoviendo de esta manera la formación del brazo de unión al antígeno con la cadena pesada y ligera correcta.

En algunos aspectos, al menos uno de los residuos de aminoácidos del par de carga se ha diseñado por ingeniería genética en el brazo de unión al antígeno (es decir, al menos

5 un residuo de aminoácido en el par no es un residuo de aminoácido silvestre). En algunos aspectos, ambos residuos de aminoácidos en el par de carga se diseñan por ingeniería genética en el brazo de unión al antígeno (es decir, ambos residuos de aminoácidos en el par no son residuos de aminoácidos silvestres).

Los residuos de aminoácidos del par de carga son típicamente naturales. Los residuos de  
10 aminoácidos naturales cargados positivamente de acuerdo con la presente descripción incluyen arginina, lisina e histidina. Los residuos de aminoácidos naturales cargados negativamente de acuerdo con la presente descripción incluyen ácido glutámico, serina, treonina y ácido aspártico. Aunque la serina y la treonina a menudo se describen en la técnica como 'no cargadas', tienen un punto isoeléctrico por debajo de 6 y, por lo tanto,  
15 están parcialmente cargadas negativamente a pH neutro. Para los fines de los pares de carga descritos en la presente, serina y treonina son ejemplos de residuos de aminoácidos cargados negativamente (junto con ácido glutámico y ácido aspártico).

Por lo tanto, un par de carga puede comprender un residuo de aminoácido cargado positivamente seleccionado de arginina, lisina o histidina ubicado en una de las  
20 posiciones en el par de carga y un residuo de aminoácido cargado negativamente seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico, serina o treonina ubicado en la otra posición en el par de carga. Por ejemplo, el par de carga puede comprender uno cualquiera de los siguientes pares de residuos de aminoácidos:

arginina y ácido aspártico;

25 arginina y ácido glutámico;

arginina y serina;

arginina y treonina;

lisina y ácido aspártico;

lisina y ácido glutámico;

5 lisina y serina;

lisina y treonina;

histidina y ácido aspártico;

histidina y ácido glutámico;

histidina y serina; y

10 histidina y treonina

En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente en el par de carga se ubica en la cadena ligera y el residuo de aminoácido cargado negativamente en el par de carga se ubica en la cadena pesada. En otros casos, el residuo de aminoácido cargado negativamente se ubica en la cadena ligera y el residuo de aminoácido cargado

15 positivamente en el par de carga se ubica en la cadena pesada. Los pares de carga se pueden introducir en varias posiciones para mejorar el emparejamiento de las cadenas ligeras y pesadas correctas en el brazo de unión al antígeno.

En algunos casos, el brazo de unión al antígeno (p. ej., el brazo de unión al antígeno CD3) comprende un par de carga lambda. Como se demuestra en la presente, se identificaron

20 residuos de aminoácidos en la interfaz entre una LC lambda y HC donde podrían introducirse pares de carga, lo que demuestra que la introducción de estos pares de carga lambda podría mejorar ventajosamente el emparejamiento de cadenas más allá de lo logrado en un formato de anticuerpo anterior que carecía de un par de carga lambda. En algunos casos, el par de carga lambda comprende un residuo de aminoácido cargado positiva o negativamente en la

25 posición 117, 119, 134, 136 o 178 de la región lambda de la cadena ligera constante (CLA).

En algunos aspectos, el par de carga lambda comprende un residuo de aminoácido cargado positiva o negativamente en la posición 141, 185, 128, 145, 183, 185, 173 o 187 de la CH1, en donde la numeración es de acuerdo con la numeración de EU.

En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en uno o más de los siguientes pares de posiciones:

- (i) posición 117 en la CL $\lambda$  y posición 141 en la CH1;
  - (ii) posición 117 en la CL $\lambda$  y posición 185 en la CH1;
  - (iii) posición 119 en la CL $\lambda$  y posición 128 en la CH1;
  - (iv) posición 134 en la CL $\lambda$  y posición 128 en la CH1;
  - 10 (v) posición 134 en la CL $\lambda$  y posición 145 en la CH1;
  - (vi) posición 134 en la CL $\lambda$  y posición 183 en la CH1;
  - (vii) posición 136 en la CL $\lambda$  y posición 185 en la CH1;
  - (viii) posición 178 en la CL $\lambda$  y posición 173 en la CH1; y
  - (ix) posición 117 en la CL $\lambda$  y posición 187 en la CH1.
- 15 En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la posición 117 en la CL $\lambda$  y la posición 141 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda se puede seleccionar de la siguiente lista:
- a. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 141 de la CH1;
  - 20 b. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 141 de la CH1;
  - c. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 141 de la CH1;
  - d. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 141 de la CH1;
  - e. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 141 de la CH1;

- f. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 141 de la CH1;
- g. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 141 de la CH1; y
- h. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 141 de la CH1.

5 En algunos casos, el par de carga lambda se selecciona de una cualquiera de a. a f. de la lista anterior. En algunos aspectos, el par de carga lambda se selecciona de una cualquiera de a. a e. de la lista anterior. En algunos aspectos, el par de carga lambda se selecciona de una cualquiera de a., b, y e. de la lista anterior. En algunos aspectos, el par de carga lambda es a. En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la

10 posición 117 en la CL $\lambda$  y la posición 185 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda se puede seleccionar de la siguiente lista:

- a. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 185 de la CH1;
- b. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 185 de la CH1;
- c. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 185 de la CH1;
- d. arginina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 185 de la CH1;
- e. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 185 de la CH1;
- f. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 185 de la CH1;
- g. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 185 de la CH1; y
- h. lisina en la posición 117 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 185 de la CH1.

En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la posición 119 en la CL $\lambda$  y la posición 128 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda

25 se puede seleccionar de la siguiente lista:

- a. arginina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 128 de la CH1;
- b. arginina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 128 de la CH1;
- 5 c. arginina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 128 de la CH1;
- d. arginina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 128 de la CH1;
- e. lisina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 128 de la CH1;
- f. lisina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 128 de la CH1;
- 10 g. lisina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 128 de la CH1; y
- h. lisina en la posición 119 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 128 de la CH1.

En algunos aspectos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la posición 134 en la CL $\lambda$  y la posición 128 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda se puede seleccionar de la siguiente lista:

- 15 a. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 128 de la CH1;
- b. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 128 de la CH1;
- c. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 128 de la CH1;
- 20 d. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 128 de la CH1;
- e. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 128 de la CH1;
- f. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 128 de la CH1;
- g. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 128 de la CH1; y
- 25 h. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 128 de la CH1.

En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la posición 134 en la CL $\lambda$  y la posición 145 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda se puede seleccionar de la siguiente lista:

- a. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 145 de la CH1;
- b. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 145 de la CH1;
- c. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 145 de la CH1;
- d. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 145 de la CH1;
- e. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 145 de la CH1;
- f. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 145 de la CH1;
- g. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 145 de la CH1; y
- h. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 145 de la CH1.

En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la posición 134 en la CL $\lambda$  y la posición 183 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda se puede seleccionar de la siguiente lista:

- a. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 183 de la CH1;
- b. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 183 de la CH1;
- c. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 183 de la CH1;
- d. arginina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 183 de la CH1;
- e. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 183 de la CH1;

- f. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 183 de la CH1;
- g. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 183 de la CH1; y
- h. lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 183 de la CH1.

5 En algunos casos, el par de carga lambda es una lisina en la posición 134 de la CL $\lambda$ , y un ácido aspártico o una serina en la posición 183 de la CH1.

En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la posición 136 en la CL $\lambda$  y la posición 185 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda se puede seleccionar de la siguiente lista:

- 10 a. arginina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 185 de la CH1;
- b. arginina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 185 de la CH1;
- c. arginina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 185 de la CH1;
- 15 d. arginina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 185 de la CH1;
- e. lisina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 185 de la CH1;
- f. lisina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 185 de la CH1;
- g. lisina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 185 de la CH1; y
- 20 h. lisina en la posición 136 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 185 de la CH1.

En algunos casos, el par de carga lambda se ubica en el par de carga que se ubica en la posición 178 en la CL $\lambda$  y la posición 173 en la CH1. Por ejemplo, el par de carga lambda se puede seleccionar de la siguiente lista:

- a. arginina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 173 de la CH1;
- 25

- b. arginina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 173 de la CH1;
- c. arginina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 173 de la CH1;
- d. arginina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 173 de la CH1;
- 5 e. lisina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y ácido aspártico en la posición 173 de la CH1;
- f. lisina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y ácido glutámico en la posición 173 de la CH1;
- g. lisina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y serina en la posición 173 de la CH1; y
- h. lisina en la posición 178 de la CL $\lambda$  y treonina en la posición 173 de la CH1.

10 En algunos casos, el brazo de unión al antígeno que comprende un par de carga lambda comprende más de un par de carga lambda. Por ejemplo, el brazo de unión al antígeno puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve pares de carga lambda en las posiciones (i) a (ix) descritas anteriormente.

En algunos casos, un brazo de unión al antígeno en el anticuerpo comprende un par de carga  
 15 kappa. Los pares de carga kappa se pueden introducir en varias posiciones para mejorar el emparejamiento de las cadenas ligeras y pesadas correctas en el brazo de unión al antígeno. Como se describió anteriormente, los pares de carga kappa se refieren a un residuo de aminoácido cargado positivamente y un residuo de aminoácido cargado negativamente, uno de los cuales se ubica en la cadena ligera kappa (p. ej., CL $\kappa$ ) y el otro en la cadena pesada  
 20 (p.ej. CH1) de un brazo de unión al antígeno, ubicado en posiciones destinadas a promover la asociación de la cadena ligera y CH1 del brazo de unión al antígeno.

En algunos casos, el brazo de unión al antígeno comprende un par de carga kappa ubicado en la posición 133 en la CL $\kappa$  y la posición 183 en la CH1. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado negativamente en el par de carga kappa está en la posición 133 de la  
 25 CL $\kappa$  y el residuo de aminoácido cargado positivamente en el par de carga kappa 183 de la

CH1. En otros casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente en el par de carga kappa está en la posición 133 de la CL $\kappa$  y el residuo de aminoácido cargado negativamente en el par de carga kappa 183 de la CH1. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado negativamente (p. ej., en la posición 133 de la CL $\kappa$ ) es un ácido glutámico, y en donde el residuo de aminoácido cargado positivamente (p. ej., en la posición 183 de la CH1) es una lisina. Como se señaló en otra parte, esta numeración es de acuerdo a la numeración de EU. En algunos casos, uno de los brazos de unión al antígeno en el anticuerpo comprende un par de carga lambda y otro brazo de unión al antígeno (diferente) en el anticuerpo comprende un par de carga kappa. Como se ejemplifica en la presente, el brazo de unión al antígeno CD3 puede comprender un par de carga lambda y el brazo de unión al antígeno diana (p. ej., el brazo de unión al antígeno TAA) comprende un par de carga kappa. Alternativamente, el brazo de unión al antígeno diana (p. ej., el brazo de unión al antígeno TAA) puede comprender un par de carga lambda y el brazo de unión al antígeno CD3 puede comprender un par de carga kappa.

La referencia en la presente al par o dominio de carga singular (p. ej., “a” o “el”) también abarca múltiples pares de carga o múltiples dominios, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera.

Los pares de carga descritos en la presente pueden combinarse con otras estrategias para promover la heterodimerización para aumentar aún más el emparejamiento correcto de polipéptidos de cadena pesada y ligera.

Los ejemplos no limitantes de estrategias para promover la heterodimerización se describen con más detalle a continuación e incluyen el uso de disulfuro diseñado por ingeniería genética en la interfaz CH1/CL, la introducción de pares de carga adicionales (p. ej., pares de carga kappa) y modificaciones de la región Fc tales como botones en ojales y permiten estrategias de purificación fraccionadas.

### Modificaciones de la región Fc

En algunos casos, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una o más modificaciones en uno o más de los dominios CH1, CH2 y CH3 que promueven la formación de una molécula de anticuerpo heterodimérico facilitando la formación de las regiones Fc presentes en el anticuerpo. Esto puede implicar una estrategia botones en ojales (KiH, por sus siglas en inglés) basada en sustituciones de aminoácidos únicas en los dominios CH3 que promueven la heterodimerización de la cadena pesada como se describe en Ridgway, 1996. La cadena pesada CH3 de la variante de botón tiene un aminoácido pequeño que ha sido sustituido por uno más grande, generando de esta manera una protuberancia (botón) en la superficie de dicho dominio CH3, y la variante de ojal tiene un aminoácido grande que se ha sustituido por uno más pequeño generando de esta manera una cavidad (ojal) en la superficie de dicho dominio CH3. También pueden introducirse modificaciones adicionales para estabilizar la asociación entre las cadenas pesadas.

Las modificaciones de CH3 para mejorar la heterodimerización incluyen, por ejemplo, mutaciones de “ojal” Y407V/T366S/L368A en una región Fc y la mutación “botón” T366W en la otra región Fc. Estos pueden incluir además la estabilización de mutaciones de cistina Y349C (p. ej., en la región Fc con la mutación de “ojal”) y la estabilización de la mutación S354C en la otra región Fc (p. ej., en la región Fc con la mutación “botón”).

En consecuencia, en un caso, la sustitución para generar un botón es una sustitución por triptófano en la posición 366 y la sustitución para generar un ojal es una o más de las siguientes:

- i) una sustitución por valina en la posición 407;
- ii) una sustitución por serina en la posición 366; y
- iii) una sustitución por alanina en la posición 368.

Por ejemplo, la única región Fc puede incluir una modificación para permitir la elución fraccionada por cromatografía de proteína A como se describe en Tustian, 2016.

Brevemente, una de las regiones Fc puede comprender una modificación que elimina la unión a la proteína A (denominado Fc\*), lo que permite la purificación selectiva del producto

5    bienespecífico heterodimérico FcFc\*. Ejemplos de modificaciones adecuadas para generar una región Fc\* incluyen la sustitución de H435 con arginina e Y436 con fenilalanina.

Otras modificaciones de Fc que se pueden usar además de las usadas para mejorar la heterodimerización son aquellas que reducen o anulan la unión de la molécula de

anticuerpo a uno o más receptores Fcγ, tales como FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII y/o

10    para complementar. Tales mutaciones reducen o anulan las funciones efectoras de Fc.

Se conocen mutaciones que reducen o anulan la unión de una molécula de anticuerpo a uno o más receptores Fcγ y/o complemento e incluyen la “triple mutación” o “TM” de

L234F/L235E/P331S (de acuerdo con la convención de numeración de la Unión

Europea) descrita por ejemplo en Organesyan *et al.*, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr

15    64(6): 700-704, 2008.

En algunos aspectos, el dominio CH2 de uno o ambos dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende las siguientes sustituciones:

E233P/L234V/L235A/G236del/S267K. Esta combinación de mutaciones puede denominarse en la presente como la “mutación nula del efector Fc”.

20    En la técnica se conocen otras sustituciones o modificaciones de aminoácidos de la región

Fc adecuadas e incluyen, por ejemplo, la sustitución triple de metionina (M, por sus siglas en inglés) a tirosina (Y, por sus siglas en inglés) en la posición 252, una sustitución de

serina (S) a treonina (T) en la posición 254, y una sustitución de treonina (T) a ácido

glutámico (E) en la posición 256, enumeradas de acuerdo con el índice EU de acuerdo con

25    Rabat (M252Y/S254T/T256E; denominada “YTE” o “mutación YTE”) (ver, p. ej., la patente

de los EE. UU. núm. 7.658.921; publicación de solicitud de patente de los EE. UU.

2014/0302058; y Yu et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61(1): e01020-16 (2017), cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad).

Esta combinación de mutaciones puede extender la vida media del anticuerpo.

- 5 La triple mutación, mutación nula del efector Fc y mutación YTE, cuando están presentes, pueden estar presentes en uno o ambos dominios constantes de cadena pesada. Por lo general, si se incluyen, se incluyen en ambos dominios constantes de cadena pesada. En algunos aspectos la región Fc comprende la mutación YTE y la triple mutación. En otros aspectos la región Fc comprende la mutación YTE y la mutación nula del efector Fc.

10

#### Disulfuros diseñados por ingeniería genética

En algunos casos, los anticuerpos contienen disulfuros diseñados por ingeniería genética. Por “disulfuros diseñados por ingeniería genética” se entiende que un enlace disulfuro intercadena nativo en la interfaz CH1-CL (p. ej., en 220 de la CH1 y 212 de la

- 15 LC) del brazo de unión al antígeno, y opcionalmente uno o más brazos de unión al antígeno adicionales, ha sido reemplazado por un disulfuro intercadena diseñado por ingeniería genética (no nativo). Un disulfuro diseñado por ingeniería genética se forma típicamente diseñando por ingeniería genética cisteínas en la CL de una cadena ligera y la CH1 de la cadena pesada correspondiente y reemplazando las cisteínas que
- 20 normalmente forman el disulfuro intercadena. La descripción relacionada con la introducción de disulfuro diseñado por ingeniería genética en anticuerpos para promover la heterodimerización se puede encontrar, p. ej., en la patente de los EE. UU. núm. 9.527.927, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

En algunos casos, el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 en al menos uno de los brazos de unión al antígeno se forma entre un par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la cadena ligera y CH1 de ese brazo de unión al antígeno.

En algunos casos:

- 5           (i)       el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 en el brazo de unión al antígeno CD3 se forma entre un par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la cadena ligera y la CH1 del brazo de unión al antígeno CD3, y el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 en el brazo de unión al antígeno diana se forma entre un par de cisteínas nativas. En la Figura 20 se proporciona un esquema de este ejemplo; o
- 10          (ii)       el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 en el brazo de unión al antígeno diana se forma entre un par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la cadena ligera y la CH1 del brazo de unión al antígeno diana, y el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 en el brazo de unión al antígeno CD3 se forma entre un par de cisteínas nativas.
- 15   En algunos casos, donde el anticuerpo está en un formato '2+1' descrito en la presente:
  - (i)       el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 en el brazo de unión al antígeno CD3 se forma entre un par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la cadena ligera y la CH1 en el brazo de unión al antígeno CD3, y los enlaces disulfuro entre las cadenas ligeras y CH1 en los dos brazos de unión al
  - 20       antígeno diana se forman entre pares de cisteínas nativas. En la Figura 21 se proporciona un esquema de este ejemplo;
  - (ii)       los enlaces disulfuro entre las cadenas ligeras y CH1 en los dos brazos de unión al antígeno diana se forman entre pares de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en las cadenas ligeras y CH1 en los dos brazos de unión al

antígeno diana, y el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 en el brazo de unión al antígeno CD3 se forma entre un par de cisteínas nativas; o

(iii) los tres brazos de unión al antígeno contienen disulfuros diseñados por ingeniería genética, pero las cisteínas diseñadas por ingeniería genética en el

5 brazo de unión al antígeno CD3 están en diferentes posiciones (p. ej., en la cadena ligera) con respecto a las cisteínas diseñadas por ingeniería genética en los brazos de unión al antígeno diana.

En algunos casos, cuando el anticuerpo está en un formato triespecífico descrito en la presente, el enlace disulfuro entre la cadena ligera y CH1 del primer brazo de unión al  
 10 antígeno (p. ej., el brazo de unión al antígeno CD3) se forma entre un par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la cadena ligera y CH1 del primer brazo de unión al antígeno, el enlace disulfuro formado entre la cadena ligera y CH1 del segundo brazo de unión al antígeno (p. ej., el brazo de unión al antígeno diana) se forma entre un par de cisteínas nativas del segundo brazo de unión al antígeno, y el enlace disulfuro formado  
 15 entre la cadena ligera y CH1 del tercer brazo de unión al antígeno (p. ej., un brazo de unión al antígeno diana CD8 o un dominio de unión al antígeno diana que se une a una diana diferente que el segundo brazo de unión al antígeno) se forma entre un par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la cadena ligera y CH1 del primer brazo de unión al antígeno. En la Figura 22 se proporciona un esquema de este ejemplo.

20 En los casos en que tanto el primer como el tercer brazo de unión al antígeno contienen disulfuros diseñados por ingeniería genética, es deseable que el disulfuro diseñado por ingeniería genética introducido en el tercer brazo de unión al antígeno sea diferente del disulfuro diseñado introducido en el primer brazo de unión al antígeno, ya que se cree  
 25 que esto mejora aún más el emparejamiento correcto. Por lo tanto, opcionalmente, el par

de cisteínas insertadas en el tercer brazo de unión al antígeno están en diferentes posiciones de residuos de aminoácidos con respecto al par de cisteínas insertadas en el primer brazo de unión al antígeno.

- 5 Como se describió anteriormente, las cadenas ligeras pueden comprender una CL $\lambda$  o una CL $\kappa$ . En algunos casos, el par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la CL $\lambda$  y CH1 se ubican en la posición 122 de la CL $\lambda$  y la posición 126 de la CH1, y en donde la misma CL $\lambda$  comprende un residuo distinto de la cisteína en la posición 212 y la misma CH1 comprende un residuo distinto de la cisteína en la posición 220. En algunos casos,
- 10 los residuos distintos de la cisteína son valinas.

Una secuencia de aminoácidos ilustrativa de una CL $\lambda$  que comprende una cisteína diseñada por ingeniería genética se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 107 y una secuencia de aminoácidos ilustrativa de la CH1 que comprende la cisteína diseñada por ingeniería genética correspondiente para formar el disulfuro diseñado por ingeniería

15 genética se proporciona como la sec. con. núm. de ident.: 108.

En algunos casos, el par de cisteínas diseñadas por ingeniería genética en la región kappa de cadena ligera constante (CL $\kappa$ ) y CH1 se ubican en la posición 121 de la CL $\kappa$  y la posición 126 de la CH1, y en donde la misma CL $\kappa$  comprende un residuo distinto de la cisteína en la posición 214 y la misma CH1 comprende un residuo distinto de la cisteína

20 en la posición 220. En algunos casos, los residuos distintos de la cisteína son valinas.

En algunos casos, el anticuerpo está en un formato 'DuetMab', p. ej., como se describe en la patente de los EE. UU. núm. 9.527.927. Un DuetMab incluye disulfuros diseñados por ingeniería genética para mejorar el emparejamiento correcto de cadena pesada/ligera y modificaciones de la región Fc para mejorar la heterodimerización

25 correcta de las cadenas pesadas.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende:

un brazo de unión al antígeno CD3 como se describió anteriormente que comprende una primera región Fc; y

un brazo de unión al antígeno diana como se describió anteriormente que  
5 comprende una segunda región Fc,

en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden modificaciones para facilitar la heterodimerización de la primera y segunda regiones Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende:

10 un brazo de unión al antígeno CD3 como se describió anteriormente que comprende una primera región Fc; y

un brazo de unión al antígeno diana como se describió anteriormente que comprende una segunda región Fc,

en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden modificaciones para  
15 facilitar la heterodimerización de la primera y segunda regiones Fc, y en donde el anticuerpo comprende disulfuros diseñados por ingeniería genética.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende:

un brazo de unión al antígeno CD3 que comprende un par de carga lambda como  
20 se describió anteriormente y una primera región Fc; y

un brazo de unión al antígeno diana como se describió anteriormente que comprende una segunda región Fc,

en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden modificaciones para facilitar la heterodimerización de la primera y segunda regiones Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende:

un brazo de unión al antígeno CD3 que comprende un par de carga lambda como se describió anteriormente y una primera región Fc; y

un brazo de unión al antígeno diana como se describió anteriormente que  
5 comprende una segunda región Fc,

en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden modificaciones para facilitar la heterodimerización de la primera y segunda regiones Fc, y en donde el anticuerpo comprende disulfuros diseñados por ingeniería genética.

10 En algunos aspectos, el anticuerpo comprende:

un brazo de unión al antígeno CD3 que comprende un par de carga lambda como se describió anteriormente y una primera región Fc; y

un brazo de unión al antígeno diana que comprende un par de carga kappa como se ha descrito anteriormente y una segunda región Fc,

15 en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden modificaciones para facilitar la heterodimerización de la primera y segunda regiones Fc.

En algunos aspectos, el anticuerpo multiespecífico comprende:

un brazo de unión al antígeno CD3 que comprende un par de carga lambda como  
20 se describió anteriormente y una primera región Fc; y

un brazo de unión al antígeno diana que comprende un par de carga kappa como se ha descrito anteriormente y una segunda región Fc,

en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden modificaciones para facilitar la heterodimerización de la primera y segunda regiones Fc, y en donde el  
25 anticuerpo multiespecífico comprende disulfuros diseñados por ingeniería genética.

Se proporcionan como ejemplos, los ejemplos no limitantes de anticuerpos comprenden un par de carga lambda, un par de carga kappa, disulfuros diseñados por ingeniería genética y modificaciones para facilitar la heterodimerización de la primera y segunda regiones Fc.

5

### Identidad de secuencia y mutaciones

En algunos casos, la CL $\lambda$  descrita en la presente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la sec. con. núm. de ident.: 105 o la sec. con. núm. de ident.: 107. En algunos casos, la CL $\lambda$  comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 105 o la sec. con. núm. de ident.: 107 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

En algunos casos, la CL $\kappa$  descrita en la presente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la sec. con. núm. de ident.: 106. En algunos casos, la CL $\kappa$  comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 106 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

En algunos casos, la CH1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la sec. con. núm. de ident.: 101 o la sec. con. núm. de ident.: 108. En algunos casos, la CH1 comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 101 o la sec. con. núm. de ident.: 108 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

En algunos casos, la CH2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la sec. con. núm. de ident.: 102. En algunos casos, la CH2 comprende una secuencia de

25

aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 102 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

En algunos casos, la CH3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la sec. con. núm. de ident.: 103. En algunos casos, la CH3 comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 103 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

Las modificaciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en las regiones constantes (CL $\lambda$ , CL $\kappa$ , CH1, CH2 y CH3 pueden ser adicionales a las modificaciones descritas

anteriormente para introducir los pares de carga, disulfuros diseñados por ingeniería genética y/o modificaciones de la región Fc descritas anteriormente. Por ejemplo, en comparación con la CL $\lambda$  silvestre establecida en la sec. con. núm. de ident.: 105, la CL $\lambda$  usada en el anticuerpo puede contener una mutación del par de carga lambda, un disulfuro diseñado por ingeniería genética (p. ej., S122C y C212V) y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos adicionales. Como otro ejemplo, en comparación con la CH1 silvestre proporcionada en la sec. con. núm. de ident.: 101, una CH1 usada en el anticuerpo puede contener una mutación de carga lambda, un disulfuro diseñado por ingeniería genética (p. ej., F126C, C220V) y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos adicionales.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de las secuencias de aminoácidos definidas en (16) - (24) anterior. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH que tiene las secuencias de aminoácidos definidas en (16) - (24) anterior con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de las secuencias de

aminoácidos definidas en (25) - (27) anterior. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VL que tiene las secuencias de aminoácidos definidas en (25) - (27) anterior con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

Las regiones CL $\lambda$  descritas en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos que

5 tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la sec. con. núm. de ident.: 105 o la sec. con. núm. de ident.: 107. En algunos casos, la CL $\lambda$  comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 105 o la sec. con. núm. de ident.: 107 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno CD3 comprende una región VH de

10 acuerdo con una cualquiera de (16) a (24) a continuación:

Una modificación de aminoácido puede ser una inserción, una sustitución o una deleción. En algunos aspectos, la modificación de aminoácidos es una sustitución de un residuo de aminoácido por cualquier otro residuo de aminoácido natural o no natural.

Los residuos naturales pueden dividirse en clases basados en las propiedades comunes

15 de la cadena lateral:

- 1) no polar, alifática: glicina (G), metionina (M), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I);
- 2) polar: cisteína (C), asparagina (N), glutamina (Q), prolina (P);
- 3) polar, parcialmente cargado negativamente: serina (S), treonina (T);
- 20 4) ácido (cargado negativamente): ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 5) básico (cargado positivamente): histidina (H), lisina (K), arginina (R);
- 6) aromático: triptófano (W), tirosina (Y), fenilalanina (F).

Como se describió anteriormente, la serina (S) y la treonina (T) tienen un punto isoelectrico por debajo de 6 y están parcialmente cargadas negativamente a pH neutro, de ahí que se

25 clasifique en la presente como 'polares, parcialmente cargados negativamente'.

La sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservadora de aminoácidos.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con otro miembro de la misma clase. Por ejemplo, una sustitución conservadora de aminoácidos puede ser una sustitución del ácido glutámico del aminoácido ácido (E) por el ácido aspártico del aminoácido ácido (D).

### Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

También se proporciona en la presente uno o más ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) el anticuerpo descrito en la presente. En algunos casos, el (los) ácido(s) nucleico(s) está/son purificado(s) o aislado(s), p. ej., de otro ácido nucleico, o material biológico natural. El experto en la técnica no tendría dificultad para preparar tales moléculas de ácido nucleico usando métodos muy conocidos en la técnica.

En algunos casos, el uno o más ácidos nucleicos codifican una cadena ligera como se describe en la presente y/o una CH1 como se describe en la presente. El uno o más ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) la CH1 pueden codificar además otros dominios de cadena pesada, p. ej., la bisagra, CH2 y CH3, y pueden codificar una cadena pesada completa.

La presente descripción también proporciona uno o más vectores que comprenden ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) un anticuerpo o fragmento de este descrito en la presente. Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contengan secuencias reguladoras

apropiadas, que incluyen secuencias promotora, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Preferentemente, el vector contiene secuencias reguladoras apropiadas para impulsar la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos p. ej., fagos, o fagémidos, según sea apropiado.

El anticuerpo puede producirse a partir de un vector de cadena ligera y un vector de cadena pesada. Un vector de cadena ligera puede contener el ácido nucleico que codifica una de las cadenas ligeras en el anticuerpo y el ácido nucleico que codifica el otro ácido de cadena ligera, que puede estar presente en el vector como casetes separados (p. ej.,  
5 cada uno conectado operativamente a un promotor diferente). De manera similar, puede usarse un vector de cadena pesada para codificar tanto la CH1 (y la región Fc, si está presente) de un brazo de unión al antígeno como la CH1 (y la región Fc, si está presente) del otro brazo de unión al antígeno, que puede estar presente en el vector como casetes separados. Alternativamente, pueden usarse vectores separados para codificar cada una  
10 de las cadenas ligeras, las CH1 y las regiones Fc (si están presentes).

Una molécula o vector de ácido nucleico como se describe en la presente puede introducirse en una célula huésped. Las técnicas para la introducción de ácido nucleico o vectores en células huésped están muy establecidas en la técnica y puede emplearse cualquier técnica adecuada. En la técnica se conoce una gama de células huésped  
15 adecuadas para la producción de moléculas de anticuerpo recombinante, e incluyen células huésped bacterianas, de levadura, de insectos o de mamíferos. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula de mamífero, tal como una célula CHO, NS0, o HEK, por ejemplo una célula HEK293. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula CHO.

## 20 Métodos de producción de los anticuerpos

También se proporciona en la presente un método para producir el anticuerpo descrito en la presente. Las técnicas para la purificación de moléculas de anticuerpos recombinantes son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía líquida rápida de proteínas, cromatografía de  
25 intercambio iónico y cromatografía de afinidad, p. ej., usando proteína A o proteína L o

uniéndose a una etiqueta de afinidad. En algunos casos, la purificación se realiza usando cromatografía de afinidad (p. ej., cromatografía de afinidad de proteína A). En algunos casos, la purificación comprende además (p. ej., además de la cromatografía de proteína A) cromatografía de afinidad de cadena ligera.

- 5 El método también puede comprender formular la molécula de anticuerpo en una composición farmacéutica, opcionalmente con un excipiente farmacéuticamente aceptable u otra sustancia como se describe a continuación.

### Tratamiento

- 10 Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser útiles para aplicaciones terapéuticas, tales como en el tratamiento del cáncer.

Un anticuerpo como se describe en la presente puede usarse en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal. Los aspectos relacionados de la descripción proporcionan;

- 15 (i) un anticuerpo descrito en la presente para usar como medicamento,  
(ii) un anticuerpo descrito en la presente para usar en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno,  
(iii) un anticuerpo descrito en la presente en la elaboración de un medicamento para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno; y,  
20 (iv) un método para tratar una enfermedad o trastorno en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo descrito en la presente.

El individuo puede ser un paciente, preferentemente un paciente humano.

El tratamiento puede ser cualquier tratamiento o terapia en la que se logre algún efecto

- 25 terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición o retraso del proceso de la afección, e incluye

una reducción en la tasa de progreso, una detención en la tasa de progreso, mejora de la afección, cura o remisión (ya sea parcial o total) de la afección, prevención, mejoría, retraso, reducción o detención de uno o más síntomas y/o signos de la afección o prolongar la supervivencia de un individuo o paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento.

- 5 También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis). Por ejemplo, un individuo susceptible o en riesgo de la aparición o reaparición de una enfermedad tal como el cáncer puede tratarse como se describe en la presente. Tal tratamiento puede prevenir o retrasar la aparición o reaparición de la enfermedad en el individuo.

Mientras que un anticuerpo puede administrarse solo, los anticuerpos o fragmentos de  
10 estos se administrarán normalmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo. Por lo tanto, otro aspecto de la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se describe en la presente. También se proporciona un método que comprende formular un anticuerpo en una composición farmacéutica.

- 15 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además del anticuerpo, un excipiente, portador, regulador, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables muy conocidos por los expertos en la técnica. El término “farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente se refiere a los compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio  
20 médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos de un sujeto (p. ej., ser humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcionales con una relación beneficio/riesgo razonable.

La administración puede ser en una “cantidad terapéuticamente efectiva”, siendo esto suficiente para mostrar beneficio a un individuo. La cantidad real administrada, y la  
25 velocidad y el curso temporal de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad

de lo que se esté tratando, el individuo particular que se esté tratando, la condición clínica del individuo, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de molécula de anticuerpo, el método de administración y la programación de administración.

\*\*\*

- 5 Las características descritas en la descripción anterior, o en las siguientes reivindicaciones, o en los dibujos adjuntos, expresadas en sus formas específicas o en términos de un medio para realizar la función descrita, o un método o proceso para obtener los resultados descritos, según corresponda, pueden utilizarse, por separado, o en cualquier combinación de tales características, para realizar la descripción en diversas formas de estas.
- 10 Aunque la descripción se ha realizado junto con los casos ilustrativos descritos anteriormente, muchas modificaciones y variaciones equivalentes serán evidentes para los expertos en la técnica cuando se dé esta descripción. En consecuencia, los casos ilustrativos de la descripción establecidos anteriormente se consideran ilustrativos y no limitantes. Se pueden realizar diversos cambios en los casos descritos sin apartarse del
- 15 espíritu y alcance de la descripción.

Para evitar cualquier duda, se proporcionan las explicaciones teóricas aquí proporcionadas con el fin de mejorar la comprensión de un lector. Cualquier encabezado de sección usados en la presente descripción son solamente para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita.

- 20 A lo largo de esta memoria descriptiva, que incluye las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra “comprende” e “incluye”, y variaciones tales como “comprende”, “que comprende”, y “que incluye”, implicará la inclusión de un entero o etapa o grupo de enteros o etapas establecido pero no la exclusión de cualquier otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas.

Cabe señalar que, tal como se usa en la especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Los intervalos pueden expresarse en la presente descripción como desde “aproximadamente” un valor particular, y/o hasta “aproximadamente” otro valor particular. Cuando se expresa tal rango, otro aspecto incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico es opcional y significa por ejemplo +/- 10 %.

10

### Secuencias

| Sec. con<br>núm. de<br>ident.: | Descripción                   | Secuencia                                                                                                                         |
|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                              | V <sub>K</sub> parental       | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQ<br>SPQSLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCG<br>QGTQYPFTFGSGTKVEIK          |
| 2                              | V <sub>K</sub> parental LCDR1 | KSSQSLVHNNANTYLS                                                                                                                  |
| 3                              | V <sub>K</sub> parental LCDR2 | KVSNRFS                                                                                                                           |
| 4                              | V <sub>K</sub> parental LCDR3 | GQGTQYPFT                                                                                                                         |
| 5                              | VH parental                   | QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFTKAWMHVWRQAPGKQL<br>EWVQAQIKDKSNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAED<br>TAVYYCRGVYYALSPFDYWGQGTTLTVSS |
| 6                              | VH HCDR1                      | KAWMH                                                                                                                             |
| 7                              | VH HCDR2                      | QIKDKSNSYATYYADSVKG                                                                                                               |
| 8                              | VH HCDR3                      | RGVYYALSPFDY                                                                                                                      |
| 9                              | V <sub>K</sub> 3              | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNQANTYLSWYLQKPGQ<br>SPQSLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCG<br>QGTQYPFTFGSGTKVEIK          |
| 10                             | V <sub>K</sub> 3 LCDR1        | RSSQSLVHNQANTYLS                                                                                                                  |
| 11                             | V <sub>K</sub> 3 LCDR2        | KVSNRFS                                                                                                                           |
| 12                             | V <sub>K</sub> 3 LCDR3        | GQGTQYPFT                                                                                                                         |
| 13                             | V <sub>K</sub> 7              | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNTGNTYLSWYLQKPGQ<br>SPQSLIYKVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCG<br>QGTQYPFTFGSGTKVEIK          |

|    |                         |                                                                                                                                                    |
|----|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14 | V <sub>k</sub> 7 LCDR1  | <u>RSSQSLVHNTGNTYLS</u>                                                                                                                            |
| 15 | V <sub>k</sub> 7 LCDR2  | <u>KVSNRAS</u>                                                                                                                                     |
| 16 | V <sub>k</sub> 7 LCDR3  | <u>GQGTQYPFT</u>                                                                                                                                   |
| 17 | V <sub>k</sub> 11       | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNQANTYLSWYLQKPGQ<br>SPQSLIY <u>KVSNRYS</u> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>G</u><br><u>QGTQYPFT</u> FGSGTKVEIK |
| 18 | V <sub>k</sub> 11 LCDR1 | <u>RSSQSLVHNQANTYLS</u>                                                                                                                            |
| 19 | V <sub>k</sub> 11 LCDR2 | <u>KVSNRYS</u>                                                                                                                                     |
| 20 | V <sub>k</sub> 11 LCDR3 | <u>GQGTQYPFT</u>                                                                                                                                   |
| 21 | VH 1                    | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLE<br>WVAQIKDKSNSYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA<br>VYYCRGVYYALSPFDYWGQGTLLTVSS                  |
| 22 | VH 1 HCDR1              | <u>KAWMH</u>                                                                                                                                       |
| 23 | VH2 HCDR2               | <u>QIKDKSNSYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                        |
| 24 | VH3 HCDR3               | <u>RGVYYALSPFDY</u>                                                                                                                                |
| 25 | VH 7                    | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTKAYMHWVRQAPGKQLE<br>WVAQIKDKSNSYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA<br>VYYCRGVYYALSPFDYWGQGTLLTVSS                  |
| 26 | VH 7 HCDR1              | <u>KAYMH</u>                                                                                                                                       |
| 27 | VH7 HCDR2               | <u>QIKDKSNSYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                        |
| 28 | VH7 HCDR3               | <u>RGVYYALSPFDY</u>                                                                                                                                |
| 29 | VH 8                    | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVAQIKDKSNSYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT<br>AVYYCRGVYYALSPFDYWGQGTLLTVSS                  |
| 30 | VH 8 HCDR1              | <u>NAWMH</u>                                                                                                                                       |
| 31 | VH 8 HCDR2              | <u>QIKDKSNSYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                        |
| 32 | VH 8 HCDR3              | <u>RGVYYALSPFDY</u>                                                                                                                                |
| 33 | VH 9                    | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTKAWMSWVRQAPGKQLE<br>WVAQIKDKSNSYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA<br>VYYCRGVYYALSPFDYWGQGTLLTVSS                  |
| 34 | VH 9 HCDR1              | <u>KAWMS</u>                                                                                                                                       |
| 35 | VH9 HCDR2               | <u>QIKDKSNSYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                        |
| 36 | VH9 HCDR3               | <u>RGVYYALSPFDY</u>                                                                                                                                |
| 37 | VH 13                   | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTKAYMHWVRQAPGKQLE<br>WVAQIKDRSQSYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT<br>AVYYCRGVYYALSPFDYWGQGTLLTVSS                  |
| 38 | VH 13 HCDR1             | <u>KAYMH</u>                                                                                                                                       |
| 39 | VH 13 HCDR2             | <u>QIKDRSQSYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                        |
| 40 | VH 13 HCDR3             | <u>RGVYYALSPFDY</u>                                                                                                                                |
| 41 | VH 21                   | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAYMHWVRQAPGKQLE<br>WVAQIKDRSQSYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT<br>AVYYCRGVYYALSPFDYWGQGTLLTVSS                  |
| 42 | VH 21 HCDR1             | <u>NAYMH</u>                                                                                                                                       |
| 43 | VH 21 HCDR2             | <u>QIKDRSQSYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                        |
| 44 | VH 21 HCDR3             | <u>RGVYYALSPFDY</u>                                                                                                                                |

|    |                         |                                                                                                                                   |
|----|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 45 | V <sub>k</sub> 17       | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNTGNTYLSWYLQKPGQ<br>SPQSLIYKVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCG<br>QGTQAPFTFGSGTKVEIK          |
| 46 | V <sub>k</sub> 17 LCDR1 | RSSQSLVHNTGNTYLS                                                                                                                  |
| 47 | V <sub>k</sub> 17 LCDR2 | KVSNRAS                                                                                                                           |
| 48 | V <sub>k</sub> 17 LCDR3 | GOGTQAPFT                                                                                                                         |
| 49 | VH 35                   | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVAQIKDRSQTYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED<br>TAVYYCRGVYYALAPFDYWGQGLTVTVSS |
| 50 | VH 35 HCDR1             | NAWMH                                                                                                                             |
| 51 | VH 35 HCDR2             | QIKDRSQTYATYYAESVKGR                                                                                                              |
| 52 | VH 35 HCDR3             | RGVYYALAPFDY                                                                                                                      |
| 53 | VH 37                   | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTKAYMHWVRQAPGKQLE<br>WVAQIKDRSQSYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT<br>AVYYCRGVYYALAPFDYWGQGLTVTVSS |
| 54 | VH 37 HCDR1             | KAYMH                                                                                                                             |
| 55 | VH 37 HCDR2             | QIKDRSQS                                                                                                                          |
| 56 | VH 37 HCDR3             | RGVYYALAPFDY                                                                                                                      |
| 57 | V <sub>k</sub> 26       | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNTGNTYLSWYLQKPGQ<br>SPQSLIYKVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCG<br>QGTQAPFSFGSGTKVEIK          |
| 58 | V <sub>k</sub> 26 LCDR1 | RSSQSLVHNTGNTYLS                                                                                                                  |
| 59 | V <sub>k</sub> 26 LCDR2 | KVSNRAS                                                                                                                           |
| 60 | V <sub>k</sub> 26 LCDR3 | GOGTQAPFS                                                                                                                         |
| 61 | V <sub>k</sub> 29       | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHNTGNTYLSWYLQKPGQ<br>SPQSLIYKVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCG<br>QGTQFPFTFGSGTKVEIK          |
| 62 | V <sub>k</sub> 29 LCDR1 | RSSQSLVHNTGNTYLS                                                                                                                  |
| 63 | V <sub>k</sub> 29 LCDR2 | KVSNRAS                                                                                                                           |
| 64 | V <sub>k</sub> 29 LCDR3 | GOGTQFPFT                                                                                                                         |
| 65 | VH R75                  | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTRAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVAQIKDRSQTYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED<br>TAVYYCRGVYYANAPFDYWGQGLTVTVSS |
| 66 | VH R75 HCDR1            | RAWMH                                                                                                                             |
| 67 | VH R75 HCDR2            | QIKDRSQTYATYYAESVKGR                                                                                                              |
| 68 | VH R75 HCDR3            | RGVYYANAPFDY                                                                                                                      |
| 69 | VH R79                  | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTRAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVAQIKDRSQTYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED<br>TAVYYCRGVYYAVTPFDYWGQGLTVTVSS |
| 70 | VH R79 HCDR1            | RAWMH                                                                                                                             |
| 71 | VH R79 HCDR2            | QIKDRSQTYATYYAESVKGR                                                                                                              |
| 72 | VH R79 HCDR3            | RGVYYAVTPFDY                                                                                                                      |
| 73 | VH R82                  | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTRAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVAQIKDRSQTYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED<br>TAVYYCRGVYYANTPFDYWGQGLTVTVSS |
| 74 | VH R82 HCDR1            | RAWMH                                                                                                                             |

|     |               |                                                                                                                                                       |
|-----|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 75  | VH R82 HCDR2  | <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                           |
| 76  | VH R82 HCDR3  | <u>RGVYYANTPFDY</u>                                                                                                                                   |
| 77  | VH SN75       | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVVA <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u> RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED<br>TAVYYC <u>RGVYYANAPFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| 78  | VH SN75 HCDR1 | <u>NAWMH</u>                                                                                                                                          |
| 79  | VH SN75 HCDR2 | <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                           |
| 80  | VH SN75 HCDR3 | <u>RGVYYANAPFDY</u>                                                                                                                                   |
| 81  | VH SN79       | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVVA <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u> RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED<br>TAVYYC <u>RGVYYAVTPFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| 82  | VH SN79 HCDR1 | <u>NAWMH</u>                                                                                                                                          |
| 83  | VH SN79 HCDR2 | <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                           |
| 84  | VH SN79 HCDR3 | <u>RGVYYAVTPFDY</u>                                                                                                                                   |
| 85  | VH SN82       | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKQL<br>EWVVA <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u> RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED<br>TAVYYC <u>RGVYYANTPFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| 86  | VH SN82 HCDR1 | <u>NAWMH</u>                                                                                                                                          |
| 87  | VH SN82 HCDR2 | <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                           |
| 88  | VH SN82 HCDR3 | <u>RGVYYANTPFDY</u>                                                                                                                                   |
| 89  | VH E75        | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTEAWMHWVRQAPGKQLE<br>WVVA <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u> RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT<br>AVYYC <u>RGVYYANAPFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| 90  | VH E75 HCDR1  | <u>EAWMH</u>                                                                                                                                          |
| 91  | VH E75 HCDR2  | <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                           |
| 92  | VH E75 HCDR3  | <u>RGVYYANAPFDY</u>                                                                                                                                   |
| 93  | VH E79        | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTEAWMHWVRQAPGKQLE<br>WVVA <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u> RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT<br>AVYYC <u>RGVYYAVTPFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| 94  | VH E79 HCDR1  | <u>EAWMH</u>                                                                                                                                          |
| 95  | VH E79 HCDR2  | <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                           |
| 96  | VH E79 HCDR3  | <u>RGVYYAVTPFDY</u>                                                                                                                                   |
| 97  | VH E82        | EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFTEAWMHWVRQAPGKQLE<br>WVVA <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u> RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT<br>AVYYC <u>RGVYYANTPFDY</u> WGQGTLLTVSS |
| 98  | VH E82 HCDR1  | <u>EAWMH</u>                                                                                                                                          |
| 99  | VH E82 HCDR2  | <u>QIKDRSQTYATYYAESVKGR</u>                                                                                                                           |
| 100 | VH E82 HCDR3  | <u>RGVYYANTPFDY</u>                                                                                                                                   |
| 101 | IgG1 CH1      | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT<br>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KRVEPKSC                                         |
| 102 | IgG1 CH2      | LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK<br>ALPAPIEKTIS                                        |
| 103 | IgG1 CH3      | GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPGK                                   |

|     |                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 104 | Constante de cadena pesada IgG1                                                                       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT<br>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD<br>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 105 | región constante lambda (CL $\lambda$ )                                                               | GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP<br>VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS<br>TVEKTVAPTECS                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 106 | región constante Kappa (CL $\kappa$ )                                                                 | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL<br>QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL<br>SSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 107 | Región CL $\lambda$ 'V12' modificada para formar un puente disulfuro diseñado por ingeniería genética | GQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS<br>PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG<br>STVEKTVAPTE <u>VS</u>                                                                                                                                                                                                                                         |
| 108 | Región CH1 'V12' modificada para formar un puente disulfuro diseñado por ingeniería genética          | ASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT<br>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KRVEPKS <u>V</u>                                                                                                                                                                                                                                             |
| 109 | CD8 VHH HCDR1                                                                                         | DDYAIG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 110 | CD8 VHH HCDR2                                                                                         | CIRVSDGSTYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 111 | CD8 VHH HCDR3                                                                                         | GSLYTCVQSIVWPAPYYDMDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 112 | CD8 VHH                                                                                               | EVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRL</sup> SCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKERE<br>GVSCIRVSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYCAAGSLYTCVQSIVWPAPYYDMDYWGQGT <sup>LVTVSS</sup>                                                                                                                                                                                                 |
| 113 | Enlazador                                                                                             | GGGGS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 114 | Enlazador                                                                                             | SGGGGS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 115 | Enlazador                                                                                             | GGGGSGGGGS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 116 | CD8 VHH HCDR1                                                                                         | TDYAIG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 117 | CD8 VHH HCDR1                                                                                         | SDYAIG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 118 | CD8 VHH                                                                                               | EVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRL</sup> SCAASGFTFTDYAIGWFRQAPGKERE<br>GVSCIRVSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYCAAGSLYTCVQSIVWPAPYYDMDYWGQGT <sup>LVTVSS</sup>                                                                                                                                                                                                 |
| 119 | CD8 VHH                                                                                               | EVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRL</sup> SCAASGFTFTDYAIGWFRQAPGKERE<br>GVSCIRVSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYCAAGSLYTCVQSIVWPAPYYDMDYWGQGT <sup>LVTVSS</sup>                                                                                                                                                                                                 |
| 120 | CD8 VHH                                                                                               | EVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRL</sup> SCAASGFTFSDYAIGWFRQAPGKERE<br>GVSCIRVSDGSTYYADSVKGRFTISRDTKNTLYLQMNSLRAEDTAV<br>YYCAAGSLYTCVQSIVWPAPYYDMDYWGQGT <sup>LVTVSS</sup>                                                                                                                                                                                                 |

## **Ejemplos**

### Ejemplo 1 — Material y métodos

#### *Células y medios*

Las líneas celulares que expresan CD3, que incluyen HPB-ALL, HSC-F, Jurkat, Jurkat  
 5 TCR KO, y líneas celulares que expresan EGFR, que incluyen NCI H358 y MDA-MB468, se obtuvieron de la American Type Culture Collection. Todas las líneas celulares excepto las células MDA-MB-468 se mantuvieron en medio RPMI 1640 suministrado con 10 % de FBS inactivado por calor y cultivadas en incubadora a 37 °C suministrada con 80 % de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células MDA-MB-468 se mantuvieron en medio L-15 de  
 10 Leibovitz suministrado con 10 % de FBS inactivado por calor y cultivadas en incubadora a 37 °C suministrada con 80 % de humedad.

#### *Constructos de expresión de anticuerpos*

Se generaron variantes anti-CD3 preliminares en formato bivalente monoespecífico IgG1  
 15 TM (L234F/L235E/P331S) para evaluaciones de afinidad y reactividad cruzada. El ADN que codifica V<sub>k</sub> y V<sub>H</sub> de las posibles variantes anti-CD3 se obtuvo de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA) y se ensambló en pOE-IgG1 TM (κLC) digerido adecuadamente usando NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs, cat. núm. E2621).

20 Para la producción de anticuerpos biespecíficos monovalentes, se usó la plataforma DuetMab (Mazor *et al.*, 2015). Constructos de expresión de EGFR-CD3 DuetMab que codifican los dominios variables de GA201 anti-EGFR (Gerdes *et al.*, 2013) y dominios variables a partir de las secuencias CD3 generadas. Debido a que tanto anti-EGFR como anti-CD3 se derivaron de anticuerpos parentales que contenían κ-se construyeron vectores  
 25 pDuetLight que codificaban la VL anti-EGFR GA201 con el dominio constante κ y cisteína

silvestre y la VL anti-CD3 con el dominio constante  $\lambda$  con S121C. Además, se construyeron vectores pDuetHeavy que codificaban las variantes VH anti-EGFR GA201 y VH anti-CD3. Estos vectores pDuetHeavy codificaban TM de IgG1 (L234F/L235E/P331S) para abolir la función efectora mediada por FC. En las transfecciones transitorias para la producción de anticuerpos solo se usaron constructos de expresión verificada por secuencia.

### *Expresión y purificación de anticuerpos*

Se produjeron variantes preliminares anti-CD3 a partir de la transfección transitoria de células HEK293F usando 293Fectin<sup>TM</sup> (Life Technologies) en medios libres de suero FreeStyle293<sup>TM</sup> de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los sobrenadantes del cultivo de células HEK293F que contenían anticuerpos se recolectaron 6 días después de la transfección, se filtraron a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu\text{m}$  y las concentraciones de anticuerpos se midieron mediante biosensores de proteína A en un instrumento Octet384 (ForteBio) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los anticuerpos se purificaron usando resina MabSelect SuRe (GE Healthcare), se eluyeron con regulador de elución IgG Pierce, pH 2,0 y se intercambiaron con regulador en solución salina regulada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), pH 7,2 (Life Technologies). La pureza del anticuerpo se evaluó mediante HP-SEC y comúnmente produjo > 95 % de monómero.

Los DuetMabs se produjeron por cotransfección transitoria de células CHO-K1 con vectores de expresión basados en pDuetHeavy y pDuetLight usando lipofectamina y medios patentados. Los sobrenadantes de cultivo celular CHO-K1 se recolectaron a los 10 o 12 días posteriores a la transfección, se filtraron y se cuantificaron los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo. Los DuetMabs se purificaron inicialmente mediante cromatografía de afinidad MabSelect SuRe y el regulador se intercambió a PBS, pH 7,2.

Después se evaluaron los DuetMabs para detectar errores de emparejamiento de cadenas ligeras mediante el análisis Bioanalyzer A (Agilent) y, cuando fue necesario, se purificaron aún más mediante cromatografía de afinidad LambdaFabSelect (Cytiva) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de haber intercambiado el regulador de los DuetMabs con PBS, pH 7,2, se cargaron los DuetMabs en una columna Superdex 200 16/600 y se recogieron las fracciones que contenían monómeros. Después se evaluaron los DuetMabs en cuanto a pureza y errores de emparejamiento de cadena ligera mediante HP-SEC y Bioanalyzer A, respectivamente. Todos los DuetMabs exhibieron > 98 % de monómero, > 95 % de emparejamiento correcto de cadena ligera y < 0,5 mg/Eu de endotoxina.

#### *HP-SEC*

Los anticuerpos se analizaron usando HP-SEC para determinar la pureza, que incluye niveles de agregado, monómero y fragmento. Se inyectaron muestras (100 µg en PBS) en un instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) serie Agilent 1200 y se separaron usando una columna de exclusión por tamaño TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience núm. 08541). La fase móvil fue 100 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), y el caudal de la muestra fue de 1 ml/min. Las proteínas se detectaron usando absorbancia a 280 nm.

#### *Medición de citometría de flujo*

Se usó la citometría de flujo para determinar la unión específica del antígeno de superficie celular. Se usaron las líneas de células T de leucemia humana HPB-ALL, Jurkat, Jurkat TCR KO y la línea de células T cynomolgus HSC-F para evaluar la unión de CD3 humano y CD3 de cynomolgus, respectivamente. Brevemente, se suspendieron  $1 \times 10^5$  células en regulador FACS (1x PBS, pH 7,2 complementado con 2 % de FBS inactivado por calor, 0,1 % de azida

sódica y 2 mM de EDTA) y se colocaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Los anticuerpos se diluyeron a diversas concentraciones usando regulador FACS y se añadieron a las células. Los anticuerpos y las células se lavaron dos veces con regulador FACS después de la incubación a 4 °C durante 30 min. La unión del antígeno de superficie celular de los anticuerpos se detectó con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugado con Alexa Fluor 647 específicamente contra el fragmento Fcγ IgG humano. Los datos se recogieron usando un analizador celular BD FACSymphony A3 (BD Biosciences). Los datos se analizaron con FlowJo v10.6.1 y se trazaron usando GraphPad Prism v9.0.0.

#### 10 *Análisis de la densidad del receptor de EGF*

El análisis cuantitativo de la densidad del receptor en las líneas celulares tumorales se realizó mediante citometría de flujo en un analizador de células BD FACSymphony™ A3 (BD Biosciences). Brevemente, la IgG1 humana anti-EGFR se etiquetó por primera vez con Alexa Fluor 647 usando el kit de etiquetado de proteínas (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de anticuerpo y la relación fluorocromo a proteína (F:P) se determinaron mediante un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop). Las células tumorales desprendidas se lavaron y se resuspendieron con regulador FACS enfriado con hielo (1x PBS pH 7,2, 2 % de FBS inactivado por calor, 2 mM de EDTA y 0,1 % de azida sódica). Después se incubaron 2 x 10<sup>6</sup> células con anticuerpos conjugados Alexa Fluor 647 a concentraciones saturantes ( $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ ) durante 1 h a 4 °C. Después del lavado con regulador FACS, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA, por sus siglas en inglés) al 1,8 % enfriado con hielo y la detección de anticuerpos unidos se realizó en el analizador de células BD FACSymphony A3 usando el software BD FACSDiva™. Los resultados se analizaron usando el software de análisis FlowJo (Tree Star). Para cuantificar la densidad del receptor EGFR en las células, se analizaron perlas MESF (Moléculas de fluorocromo soluble

equivalente) Quantum Alexa Fluor 647 (Bangs Laboratories) en el citómetro de flujo usando configuraciones similares para establecer una curva estándar. Usando el programa QuickCal (Bangs Laboratories) el MESF calculado se dividió después por la relación F:P del anticuerpo para obtener una capacidad de unión del anticuerpo corregida (ABC, por sus siglas en inglés).

5

### *Citotoxicidad y activación de las células T*

La citotoxicidad mediada por células T y la activación de las células T se evaluaron por medición de citometría de flujo. Se usó como medio de ensayo un medio de crecimiento específico de células (RPMI 1640 + 10 % FBS para NCI H358 o L-15 + 10 % FBS para

10 MDA-MB-468) suplementado con 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se tiñeron un total de  $1 \times 10^4$  células diana EGFR+ (NCI H358 o MDA-MB-468) con CellTrace Violet (ThermoFisher Scientific) y se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo tratada con cultivo tisular. Se añadieron células efectoras, PBMC de un donante sano, en una proporción E:T de 10:1 y se añadieron anticuerpos en diversas concentraciones.

15 Después de un día de incubación a 37 °C en una incubadora humidificada (5 % de CO<sub>2</sub> para NCI H358 o 0 % de CO<sub>2</sub> para MDA-MB-468), todas las células del ensayo de citotoxicidad se recolectaron, se tiñeron y se analizaron mediante citometría de flujo usando un Symphony A3 (BD). Las células diana EGFR+ se identificaron mediante tinción CellTrace Violet y las células T se identificaron mediante tinción CD4+ o CD8+. La

20 activación de las células T se determinó mediante CD69+ y CD25+. Los datos se analizaron usando FlowJo v10.6.1. La citotoxicidad celular se normalizó al valor mínimo de citotoxicidad sin tratamiento con anticuerpos y se graficó usando GraphPad Prism v9.0.0.

### *Ensayo de liberación de citocina*

Las citocinas liberadas en los sobrenadantes de los ensayos de citotoxicidad se evaluaron usando el kit Luminex ProcartaPlex Human, NHP y Canine Mix & Match Panels (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las placas se leyeron en el sistema de ensayo de suspensión Bio-Plex 3D (Bio-Rad) usando el software Luminex xPONENT. Los datos se analizaron y graficaron usando GraphPad Prism v9.0.0.

### *Evaluación de la activación de las células T en ausencia de las células EGFR+*

Para evaluar el nivel de activación de las células T inducida por variantes anti-CD3 en ausencia de células EGFR+, se usó un ensayo de incubación de PBMC en placa. Se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con concentraciones variadas de enlazador de células T (50, 5,0, 0,5 nM) en 50 µl. Después las placas se lavaron dos veces con PBS, pH 7,2 antes de la adición de 150.000 PBMC en 200 µl de medio AIM V. Se incubaron las PBMC durante 48 horas a 37 °C. Después, las PBMC se transfirieron a una placa de fondo redondo de 96 pocillos, se centrifugaron y los gránulos celulares se lavaron dos veces en PBS y se tiñeron para la expresión de CD69 y CD25 usando un panel de anticuerpos anti-CD2, -CD3, -CD4, -CD8, -CD25, -CD69 por citometría de flujo.

### *Mediciones cinéticas*

Se determinó la cinética de unión de DuetMabs basados en variantes anti-CD3 usando análisis de Octet. El CD3εδ humano recombinante biotinilado (Acro Biosystems, CDD-H82W6) se inmovilizó sobre sensores de estreptavidina a una concentración de 1 µg/ml seguido de 2 veces de diluciones de DuetMabs en variantes anti-CD3. Para el DuetMab parental anti-CD3, se evaluaron concentraciones de 300 a 4,7 nM. Para DuetMabs en

variante anti-CD3, se usaron concentraciones de 5  $\mu$ M a 78,1 nM o de 8  $\mu$ M a 125 nM. La cinética se analizó usando un modelo 1:1 de unión anticuerpo:antígeno.

### AC-SINS

5 Se usó la espectroscopia de nanopartículas de autointeracción por captura de afinidad (AC-SINS, por sus siglas en inglés) para evaluar la autoasociación de anticuerpos y se realizó como se describe en otra parte (Dippel *et al.*, 2023). Brevemente, se mezclaron 5  $\mu$ l de nanopartículas con 45  $\mu$ l de anticuerpo purificado a 50  $\mu$ g/ml en PBS, pH 7,2 o regulador HSA [20 mM de histidina, 120 mM de sacarosa, 80 mM de arginina, pH 6] en  
10 una placa de 384 pocillos. Las nanopartículas se mezclaron con regulador solamente (sin anticuerpo) como control. La absorbancia se midió en un lector de placas SPECTROstar Nano UV/vis de 490 a 700 nm. La longitud de onda de la absorbancia pico se calculó en el software de análisis de datos MARS y se usó para determinar el cambio de longitud de onda en comparación con el control de solo nanopartículas.

15

### Fluorimetría diferencial de barrido

Se usó fluorimetría diferencial de barrido (DSF, por sus siglas en inglés) para evaluar las temperaturas de fusión térmica de DuetMabs. Las mediciones se realizaron usando un método previamente establecido con modificaciones menores (Shan *et al.*, 2018). Las  
20 muestras se prepararon combinando 20  $\mu$ l de muestra de proteína a 1 mg/ml en PBS, pH 7,2 con 5  $\mu$ l de tinte naranja SYPRO (Invitrogen S-6651) diluido a 40X en PBS (pH 7,2) en una placa PCR de 96 pocillos por duplicado. Se selló la placa y se realizaron las mediciones en un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems). Las muestras se sometieron a una etapa de equilibrado inicial a 25 °C durante 2 m, seguida de  
25 una rampa de temperatura a 99 °C a incrementos de 0,05 °C/s. Se monitoreó la emisión de

fluorescencia usando el conjunto de filtros FAM. El valor  $T_m$  para cada muestra se calculó en el software Protein Thermal Shift (Applied Biosystems) usando el método de Boltzmann.

### *Estabilidad acelerada y estudio de estrés por calor*

- 5 Para pruebas de estabilidad aceleradas, las muestras se diluyeron a 1 mg/ml en PBS, pH 7,2 y se incubaron durante 2 semanas a 4 °C o 45 °C. Después las muestras se analizaron mediante HP-SEC. Los porcentajes de monómero, agregado y fragmento de cada muestra se calcularon basado en la integración de la curva usando el software HPLC ChemStation (Agilent). El cambio en el contenido de monómeros, agregados y fragmentos
- 10 se calculó a partir de la diferencia entre cada muestra incubada a 45 °C versus 4 °C.

### Ejemplo 2 — Construcción del anticuerpo parental

- Se generó AZ Vk + AZ VH IgG1-TM, que se evaluó para la unión a células CD3+, que incluyen HPB ALL (CD3+ humano alto), Jurkat (CD3+ humano), Jurkat (TCR KO, CD3-
- 15 humano) y HSC-F (CD3+ de mono cynomolgus alto) mediante medición de citometría de flujo. Los resultados se resumen en la **Figura 1**. La **Figura 1** muestra que AZ Vk + AZ VH IgG1-TM mantiene la reactividad cruzada CD3 humana y de mono cynomolgus del anticuerpo parental (**Figuras 1A y B**), y exhibe unión selectiva a células CD3+ como se demuestra por la falta de unión a células Jurkat TCR KO (ver **Figuras 1C y D**).

### Ejemplo 3: mitigación de riesgos dentro de las CDR

- Las posibles desviaciones de secuencia plantean un riesgo para la elaboración a gran escala. Por ejemplo, se encontraron sitios de desamidación de NN y NG dentro de CDR L1, un sitio de oxidación de triptófano dentro de CDR H1 y un sitio de isomerización de DK y un sitio de desamidación de NS dentro de CDR H2. Por lo tanto, los esfuerzos iniciales
- 25 de diseño por ingeniería genética de CDR se enfocaron en mitigar estos riesgos.

Para mitigar los sitios de desamidación de NN y NG dentro de CDR L1, se generaron construcciones que mutaron las secuencias NNG a NQA o NTG donde los aminoácidos subrayados difieren del anti-CD3 parental. Además, se generaron constructos que también mutaron la fenilalanina en CDR L2 a alanina o tirosina, donde la alanina está presente en la línea germinal humana IGKV2D-28\*01 y la tirosina es un aminoácido hidrofóbico con estructura similar a la fenilalanina.

De manera similar, para mitigar el sitio de oxidación del triptófano dentro de CDR H1, se generaron constructos que mutaron el triptófano a tirosina. Además, se generaron constructos que mutaron treonina-lisina en la unión FW1-CDR H1 e histidina en el extremo de CDR H1 a serina-asparagina y serina, respectivamente, que están presentes en la línea germinal humana IGHV3-15\*02. Para mitigar los posibles riesgos dentro de CDR H2, DK se mutó a DR y NS a QS o QT.

Después se generaron combinaciones de las variantes Vk y VH y se evaluó la unión a HPB ALL (CD3+ humano alto), Jurkat (CD3+ humano), Jurkat (TCR KO, CD3- humano), HSC-F (CD3+ cynomolgus alto) mediante medición de citometría de flujo. Los resultados se resumen en la **Figura 2**, que muestra que las variantes exhiben un espectro de afinidades para las células CD3+ humanas y del mono cynomolgus; y lo que es más importante, las variantes mantienen la unión a las células CD3+ cynomolgus.

Se priorizaron los conductores que mantenían la unión a las células CD3+ y adicionalmente se identificaron variantes que modificaban específicamente CDR L3 y CDR H3 para impartir citotoxicidad deseable, activación de las células T y perfiles de liberación de citocinas.

#### Ejemplo 4 — Escaneo de alanina de CDR L3 y CDR H3

Para identificar los residuos dentro de la CDR L3 y la CDR H3 que estaban directa e indirectamente involucrados en el parátipo anti-CD3, se realizó mutagénesis de escaneo de alanina de estas regiones y se evaluó la unión de variantes a células CD3+ mediante

citometría de flujo. Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: (1) las variantes que eliminaron la unión a las células CD3<sup>+</sup> contenían mutaciones que interrumpían el parátipo anti-CD3; (2) las variantes que exhibían una unión disminuida contenían mutaciones que simplemente perturbaban el parátipo; (3) las variantes que exhibían unión no afectada contenían mutaciones que no estaban involucradas en el parátipo.

Los resultados muestran que las variantes de V<sub>k</sub> que contenían G91A o F96A (numeración de Kabat) eliminaron la unión de las células CD3<sup>+</sup>, las variantes que contenían G89A, Q90A, T92A mostraron una unión modestamente disminuida y las variantes que contenían Q93A, Y94A, P95A o T97A no afectaron la unión. De manera similar, las variantes de V<sub>H</sub> que contenían Y97A y A98L eliminaron la unión de las células CD3<sup>+</sup>, mientras que las variantes que contenían R93A, G94A, V95A, Y96A, P100aA, F100bA o Y102A exhibieron una unión modestamente disminuida, y las variantes que contenían L99A, S100A o D101A mostraron perfiles de unión no afectados.

#### Ejemplo 5 — Caracterización funcional de variantes anti-CD3 en un formato biespecífico relevante

La unión a las células CD3<sup>+</sup> es solo un prerrequisito para la función del activador de células T y el objetivo es optimizar la actividad funcional del brazo de unión a CD3 dentro del contexto de un activador de células T biespecífico relevante. Por lo tanto, se construyeron anticuerpos biespecíficos monovalentes basados en la plataforma bien establecida DuetMab (Mazor *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020; Dovedi *et al.*, 2021) para determinar los efectos funcionales de las variantes anti-CD3 sobre la afinidad, la citotoxicidad, la activación de las células T y la liberación de citocinas. Estos DuetMabs estaban compuestos por brazos de unión variantes anti-EGFR y anti-CD3.

Es importante señalar que la caracterización funcional de las variantes anti-CD3 fue necesaria para identificar las variantes con la afinidad, citotoxicidad, activación de las células T y liberación de citocinas adecuadas. Finalmente, se eligieron tres variantes de cadena ligera (AZ Vk 17, AZ Vk 26 y AZ Vk 29) y nueve variantes de cadena pesada (AZ VH R75, AZ VH R79, AZ VH R82, AZ VH SN75, AZ VH SN79, AZ VH SN82, AZ VH E75, AZ VH E79 y AZ VH E82) como composición de variantes anti-CD3 para una mayor investigación. Se caracterizaron exhaustivamente las veintisiete variantes anti-CD3 derivadas de estas combinaciones de Vk y VH.

Los DuetMabs variantes EGFR-CD3 se caracterizaron por su afinidad de unión celular a CD3+ y se perfilaron funcionalmente para citotoxicidad, activación de las células T y liberación de citocinas después de la exposición a células EGFR+. Para permitir comparaciones directas, todos los ensayos funcionales se completaron con un único lote de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) congeladas para evitar la heterogeneidad inherente de donante a donante de las PBMC recién aisladas. El lote de las PBMC seleccionado refleja la mediana de reactividad de las PBMC estudiadas. Además, se evaluó la actividad funcional para todas las variantes usando células NCI H358 con bajo EGFR+ ( $3,1 \times 10^4 \pm$  receptores/célula) (Mazor *et al.*, 2017) y variantes seleccionadas usando MDA-MB-468 con alto EGFR+ ( $1,1 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^4$  receptores/célula).

Los resultados se muestran en las Figuras 3 a 17. Los DuetMabs que contienen variantes anti-CD3 exhiben una afinidad variable por las células CD3+, citotoxicidad de las células EGFR+, activación de las células T y perfiles de liberación de citocinas. Además, las respuestas funcionales provocadas por los DuetMabs variantes EGFR-CD3 dependían del EGFR. Por ejemplo, los DuetMabs que exhibieron muy poca actividad

después de la exposición al NCI H358 con bajo EGFR+ exhibieron una actividad mejorada en el MDA-MB-468 con alto EGFR+. Por lo tanto, la composición óptima de la variante anti-CD3 de los activadores de células T se puede seleccionar basado en la densidad de TAA deseada o el formato TAA-CD3 (1+1, 2+1, 1+1+1, etc.).

5

*Ejemplo 6 — Evaluación de la activación de las células T en ausencia de células diana*

Se evaluó el rendimiento de los activadores de células T basados en la variante anti-CD3 en presencia de células T y células diana EGFR+. Sin embargo, también era importante comprender el comportamiento de los activadores de células T que contienen variantes anti-  
 10 CD3 en ausencia de células EGFR+, ya que la activación prematura de las células T puede provocar toxicidades indeseables y síndrome de liberación de citocinas (CRS) *in vivo*.

Para evaluar el nivel de activación de las células T inducido por activadores de células T que contienen variantes anti-CD3 en ausencia de células EGFR+, se usó un ensayo de incubación  
 15 de PBMC basado en placas. En este ensayo, las PBMC se incubaron en placas de 96 pocillos que habían sido recubiertas previamente con concentraciones variadas de candidatos a activadores de células T (50, 5,0, 0,5 nM). Después de la exposición durante 48 horas, el nivel de activación de las células T de las células T CD4+ y CD8+ se caracterizó por citometría de flujo usando marcadores CD25 y CD69. Los resultados se resumen en la Figura 18 e indican  
 20 que todos los activadores de células T que contienen variantes anti-CD3 exhiben una activación de células T reducida en comparación con el control basado en anti-CD3.

### Ejemplo 7 — Medición cinética

La cinética de unión de los anticuerpos anti-variante CD3 se determinó mediante análisis de Octet. Los resultados se muestran en la **Figura 19** y la **Tabla 1**. Las variantes exhibieron una reducción entre 10 a 100 veces en la afinidad CD3 humana.

5

| Variante $\alpha$ CD3 | K <sub>D</sub> (M) | K <sub>D</sub> Error | k <sub>a</sub> (1/Ms) | k <sub>a</sub> Error | k <sub>dis</sub> (1/s) | Error de k <sub>dis</sub> | X <sup>2</sup> completo | R <sup>2</sup> completo |
|-----------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Anti-CD3 parental     | 2,43E-08           | 1,89E-11             | 4,33E+04              | 2,39E+01             | 1,05E-03               | 5,78E-07                  | 0,3325                  | 0,9999                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH R75  | 2,66E-07           | 9,61E-10             | 2,42E+04              | 4,84E+01             | 6,44E-03               | 1,93E-05                  | 0,4807                  | 0,9994                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH R79  | 7,34E-07           | 1,60E-09             | 2,46E+04              | 4,51E+01             | 1,80E-02               | 2,13E-05                  | 0,3476                  | 0,9996                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH R82  | 5,50E-07           | 1,52E-09             | 1,69E+04              | 3,12E+01             | 9,28E-03               | 1,90E-05                  | 0,4113                  | 0,9994                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH SN75 | 8,53E-07           | 1,36E-09             | 1,08E+04              | 1,18E+01             | 9,23E-03               | 1,07E-05                  | 0,1095                  | 0,9998                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH SN79 | 2,05E-06           | 6,69E-09             | 1,56E+04              | 4,25E+01             | 3,20E-02               | 5,73E-05                  | 0,1498                  | 0,9996                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH SN82 | 1,64E-06           | 4,56E-09             | 9,10E+03              | 1,73E+01             | 1,49E-02               | 3,03E-05                  | 0,0948                  | 0,9998                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH E75  | 2,79E-06           | 9,34E-09             | 7,10E+03              | 1,94E+01             | 1,98E-02               | 3,85E-05                  | 0,1017                  | 0,9997                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH E79  | 5,62E-06           | 4,17E-08             | 8,85E+03              | 5,51E+01             | 4,97E-02               | 2,00E-04                  | 0,1967                  | 0,9991                  |
| AZ Vk 17 + AZ VH E82  | 4,61E-06           | 2,34E-08             | 7,14E+03              | 3,28E+01             | 3,30E-02               | 7,14E-05                  | 0,0948                  | 0,9995                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH R75  | 2,17E-07           | 7,79E-10             | 2,79E+04              | 5,32E+01             | 6,05E-03               | 1,84E-05                  | 0,5034                  | 0,9994                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH R79  | 7,12E-07           | 2,07E-09             | 3,27E+04              | 8,39E+01             | 2,33E-02               | 3,20E-05                  | 0,5156                  | 0,9992                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH R82  | 4,11E-07           | 1,03E-09             | 1,73E+04              | 2,54E+01             | 7,11E-03               | 1,44E-05                  | 0,3284                  | 0,9996                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH SN75 | 9,49E-07           | 2,84E-09             | 1,63E+04              | 3,09E+01             | 1,55E-02               | 3,59E-05                  | 0,1873                  | 0,9997                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH SN79 | 1,93E-06           | 6,31E-09             | 1,87E+04              | 5,19E+01             | 3,61E-02               | 6,26E-05                  | 0,1571                  | 0,9996                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH SN82 | 1,71E-06           | 4,44E-09             | 1,24E+04              | 2,43E+01             | 2,12E-02               | 3,63E-05                  | 0,0922                  | 0,9998                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH E75  | 2,28E-06           | 4,23E-09             | 7,54E+03              | 1,05E+01             | 1,72E-02               | 2,10E-05                  | 0,0403                  | 0,9999                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH E79  | 4,66E-06           | 5,20E-08             | 1,10E+04              | 1,06E+02             | 5,11E-02               | 2,86E-04                  | 0,0884                  | 0,9988                  |
| AZ Vk 26 + AZ VH E82  | 3,92E-06           | 1,70E-08             | 7,33E+03              | 2,79E+01             | 2,87E-02               | 5,88E-05                  | 0,0846                  | 0,9995                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH R75  | 2,24E-07           | 4,97E-10             | 5,33E+04              | 8,83E+01             | 1,19E-02               | 1,76E-05                  | 0,3829                  | 0,9995                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH R79  | 8,78E-07           | 5,08E-09             | 5,55E+04              | 2,82E+02             | 4,87E-02               | 1,35E-04                  | 0,8738                  | 0,9984                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH R82  | 5,95E-07           | 1,46E-09             | 3,88E+04              | 8,40E+01             | 2,31E-02               | 2,64E-05                  | 0,4141                  | 0,9994                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH SN75 | 1,01E-06           | 3,03E-09             | 2,79E+04              | 7,63E+01             | 2,82E-02               | 3,44E-05                  | 0,3159                  | 0,9994                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH SN79 | 2,67E-06           | 3,17E-08             | 4,28E+04              | 4,64E+02             | 1,14E-01               | 5,61E-04                  | 0,2298                  | 0,9976                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH SN82 | 1,86E-06           | 5,97E-09             | 2,27E+04              | 6,33E+01             | 4,22E-02               | 6,76E-05                  | 0,1423                  | 0,9996                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH E75  | 2,22E-06           | 9,28E-09             | 1,82E+04              | 6,59E+01             | 4,04E-02               | 8,41E-05                  | 0,2000                  | 0,9994                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH E79  | 4,58E-06           | 6,12E-08             | 2,58E+04              | 3,20E+02             | 1,18E-01               | 5,91E-04                  | 0,1327                  | 0,9978                  |
| AZ Vk 29 + AZ VH E82  | 5,00E-06           | 6,23E-08             | 1,51E+04              | 1,70E+02             | 7,55E-02               | 4,02E-04                  | 0,0926                  | 0,9982                  |

**Tabla 1:** Las mediciones cinéticas de la forma soluble de CD3 se obtuvo usando un instrumento Octet384. Las constantes de disociación,  $K_D$ , se calcularon como una relación de  $k_{off}/k_{on}$  a partir de un ajuste no lineal de los datos.

### 5 Ejemplo 8 — Capacidad de desarrollo

Se ha correlacionado el mal comportamiento de los anticuerpos con un bajo éxito clínico y, como resultado, se ha vuelto cada vez más común identificar y mitigar los riesgos antes de la selección de los conductores. Para ello, las variantes anti-CD3 se caracterizaron aún más en cuanto a título de expresión, unión no específica, autoasociación reversible,

10 estabilidad térmica y propensión a la agregación y fragmentación después del estrés térmico. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en la **Tabla 2**.

| Variante $\alpha$ CD3 | ELISA BVP      |                     | Unión a HEK | AC-SINS  |          | DSF               |            | Estabilidad acelerada (45 °C, 14 d) |                         |                          |                                |
|-----------------------|----------------|---------------------|-------------|----------|----------|-------------------|------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|
|                       | Puntuación BVP | Unión de BSA/placas |             | PBS (nm) | HSA (nm) | $T_{inicio}$ (°C) | $T_m$ (°C) | Pérdida de monómero (%)             | Aumento de agregado (%) | Aumento de fragmento (%) | $\Delta$ RT desde NIP228 (min) |
| Anti-CD3 parental     | 6,42           | 0,10                | N           | 1,75     | 1,25     | 49,57             | 61,22      | -2,38                               | 0,49                    | 1,88                     | 0,07                           |
| AZ Vk 17 + AZ VH R75  | 3,85           | 0,06                | N           | 1,75     | 2,25     | 52,02             | 61,18      | -3,71                               | 0,59                    | 3,12                     | 0,07                           |
| AZ Vk 17 + AZ VH R79  | 2,87           | 0,04                | N           | 1,75     | 0,25     | 49,74             | 60,81      | -2,40                               | 1,16                    | 1,25                     | 0,09                           |
| AZ Vk 17 + AZ VH R82  | 2,87           | 0,05                | N           | 1,75     | 0,75     | 50,45             | 61,2       | -3,18                               | 0,83                    | 2,35                     | 0,06                           |
| AZ Vk 17 + AZ VH SN75 | 2,06           | 0,03                | N           | 1,25     | 0,75     | 50,27             | 61,57      | -1,67                               | 0,00                    | 1,67                     | 0,06                           |
| AZ Vk 17 + AZ VH SN79 | 2,75           | 0,04                | N           | 1,75     | 0,75     | 50,09             | 61,09      | -1,72                               | 0,35                    | 1,37                     | 0,08                           |
| AZ Vk 17 + AZ VH SN82 | 1,89           | 0,03                | N           | 1,75     | 0,75     | 50,97             | 61,47      | -1,40                               | 0,00                    | 1,40                     | 0,06                           |

|                       |      |      |   |      |      |       |       |       |      |      |      |
|-----------------------|------|------|---|------|------|-------|-------|-------|------|------|------|
| AZ Vk 17 + AZ VH E75  | 1,97 | 0,03 | N | 1,75 | 0,25 | 50,8  | 60,69 | -1,89 | 0,55 | 1,34 | 0,05 |
| AZ Vk 17 + AZ VH E79  | 2,20 | 0,03 | N | 1,25 | 0,25 | 49,57 | 60,87 | -2,14 | 0,59 | 1,55 | 0,07 |
| AZ Vk 17 + AZ VH E82  | 2,42 | 0,04 | N | 1,25 | 0,75 | 50,09 | 61,41 | -1,67 | 0,23 | 1,43 | 0,05 |
| AZ Vk 26 + AZ VH R75  | 2,12 | 0,04 | N | 1,75 | 0,75 | 51,15 | 60,58 | -2,15 | 0,79 | 1,37 | 0,06 |
| AZ Vk 26 + AZ VH R79  | 2,17 | 0,05 | N | 1,75 | 1,25 | 49,92 | 60,1  | -2,47 | 0,97 | 1,50 | 0,08 |
| AZ Vk 26 + AZ VH R82  | 2,57 | 0,05 | N | 1,75 | 0,75 | 49,74 | 60,53 | -2,33 | 0,70 | 1,64 | 0,06 |
| AZ Vk 26 + AZ VH SN75 | 1,68 | 0,03 | N | 1,25 | 0,75 | 50,79 | 61,2  | -1,81 | 0,24 | 1,56 | 0,06 |
| AZ Vk 26 + AZ VH SN79 | 2,26 | 0,04 | N | 1,75 | 0,75 | 49,92 | 60,32 | -1,94 | 0,46 | 1,48 | 0,08 |
| AZ Vk 26 + AZ VH SN82 | 2,27 | 0,04 | N | 1,75 | 1,25 | 50,27 | 60,72 | -1,31 | 0,00 | 1,31 | 0,06 |
| AZ Vk 26 + AZ VH E75  | 1,64 | 0,03 | N | 1,75 | 0,75 | 50,45 | 60,3  | -3,40 | 1,20 | 2,20 | 0,05 |
| AZ Vk 26 + AZ VH E79  | 2,08 | 0,04 | N | 1,75 | 1,25 | 50,97 | 59,85 | -5,45 | 3,34 | 2,11 | 0,07 |
| AZ Vk 26 + AZ VH E82  | 3,07 | 0,05 | N | 0,75 | 1,25 | 50,62 | 60,33 | -4,80 | 2,58 | 2,22 | 0,05 |
| AZ Vk 29 + AZ VH R75  | 5,64 | 0,07 | N | 1,75 | 0,75 | 49,39 | 60,46 | -6,13 | 2,83 | 3,30 | 0,07 |
| AZ Vk 29 + AZ VH R79  | 3,08 | 0,04 | N | 1,75 | 0,25 | 50,27 | 60,34 | -3,20 | 1,45 | 1,74 | 0,10 |
| AZ Vk 29 + AZ VH R82  | 2,61 | 0,04 | N | 1,75 | 0,75 | 50,09 | 60,58 | -4,43 | 1,80 | 2,63 | 0,07 |
| AZ Vk 29 + AZ VH SN75 | 2,13 | 0,03 | N | 1,75 | 1,25 | 50,62 | 60,79 | -2,18 | 0,00 | 2,18 | 0,06 |
| AZ Vk 29 + AZ VH SN79 | 3,08 | 0,05 | N | 1,75 | 1,25 | 49,92 | 60,36 | -3,27 | 1,05 | 2,22 | 0,08 |
| AZ Vk 29 + AZ VH SN82 | 1,73 | 0,06 | N | 1,75 | 0,75 | 50,27 | 60,66 | -2,11 | 0,23 | 1,88 | 0,06 |
| AZ Vk 29 + AZ VH E75  | 1,82 | 0,03 | N | 1,25 | 0,75 | 49,92 | 60,59 | -3,00 | 1,56 | 1,44 | 0,05 |
| AZ Vk 29 + AZ VH E79  | 2,12 | 0,03 | N | 1,25 | 0,75 | 50,09 | 60,21 | -3,83 | 1,65 | 2,18 | 0,07 |
| AZ Vk 29 + AZ VH E82  | 1,67 | 0,03 | N | 1,75 | 0,75 | 49,92 | 60,46 | -1,86 | 0,44 | 1,42 | 0,05 |

**Tabla 2:** Sumario de los perfiles con capacidad de desarrollo de anticuerpos variantes

EGFR-CD3. Antes de la caracterización bioquímica, biofísica y biológica, los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A seguida de

*cromatografía de afinidad de cadena ligera, y después se sometieron a SEC preparativa para la eliminación de agregados.*

Los DuetMabs purificados que contenían la variante anti-CD3 que exhibieron > 95 % de  
5 cadenas ligeras correctamente emparejadas y > 98 % de monómero se caracterizaron exhaustivamente para unión no específica, autoasociación reversible y estabilidad térmica. Para evaluar la unión no específica, se evaluaron los DuetMabs basados en variantes anti-CD3 usando un ELISA de partículas de baculovirus (BVP, por sus siglas en inglés) y un ensayo de unión de células de riñón embrionario humano 293 (HEK293,  
10 por sus siglas en inglés) mediante citometría de flujo. El CD3 no se expresa en las células de insectos usadas para generar las partículas de baculovirus ni en HEK293; en cambio, estos ensayos evalúan la 'pegajosidad' del anticuerpo probado. La evaluación del anticuerpo parental mostró un riesgo modesto de unión no específica a partículas de baculovirus, pero no mostró unión no específica a células HEK293. En los ensayos que  
15 evaluaron la unión no específica de las variantes anti-CD3, solo la variante AZ V<sub>k</sub> 29 + AZ V<sub>H</sub> R75 mostró un riesgo de unión no específica, donde el patrón (unión no específica a partículas de baculovirus pero no a HEK293) fue similar al anticuerpo parental, aunque en niveles más bajos. Después, se evaluó la estabilidad térmica de las variantes anti-CD3 mediante fluorimetría de barrido diferencial. Tanto el anticuerpo  
20 parental como todas las variantes anti-CD3 exhibieron temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de aproximadamente 61 °C con temperaturas al inicio de la fusión ( $T_{inicio}$ ) de ~49-50 °C.

Además de estas evaluaciones de capacidad de desarrollo, se evaluaron las variantes anti-CD3 en un estudio de estabilidad acelerada, donde los anticuerpos se incubaron a

45 °C durante 14 días y se evaluaron las muestras antes y después del estrés térmico para detectar fragmentación y agregación.

Ejemplo 9 — Anticuerpos multiespecíficos que contienen pares de carga

Para mejorar el emparejamiento correcto de cadenas más allá de lo que los disulfuros

- 5    alternativos pueden lograr en el entorno de DuetMab (ver WO 2013/096291, incorporado en la presente como referencia), se diseñaron pares de carga usando aminoácidos que participan en la interfaz de la cadena ligera (LC, por sus siglas en inglés) lambda - cadena pesada (HC, por sus siglas en inglés). Las siguientes posiciones se evaluaron como aminoácidos de la cadena ligera lambda que participan en la formación de la interfaz con el dominio CH1: T117,
- 10   F119, S122, E124, E125, K130, T132, V134, L136, S138, D139, E161, T163, S166, Q168, A174, S176, Y178, S180, en relación con los siguientes aminoácidos del dominio CH1 de la cadena pesada que participan en la formación de la interfaz con el dominio CL de cadena ligera lambda: S124, F126, L128, A129, S131, S132, K133, S134, A141, G143, L145, K147, D148, H168, F170, P171, V173, Q175, S176, S181, S183, V185, T187, V211, K213.
- 15   Estos aminoácidos se exploraron en pares o solos, un par a la vez o en combinaciones, con disulfuros intercadena alternativos o manteniendo los disulfuros nativos. La introducción de un aminoácido cargado positivamente o parcialmente positiva significa sustituir los aminoácidos existentes en esa posición con lisina y arginina y, en algunos casos, con asparagina o glutamina o histidina. La introducción de un aminoácido cargado
- 20   negativamente o parcialmente negativa significa sustituir los aminoácidos existentes en esa posición con ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina y, en algunos casos, con asparagina o glutamina. La adición de residuos de histidina en algunas de estas posiciones permitirá introducir una interacción CH1-CL dependiente del pH.

En la Tabla 3 se proporcionan nueve conjuntos de combinaciones de pares en la interfaz lambda LC-HC que cumplen los criterios mencionados anteriormente como un ejemplo no exhaustivo y se probaron para mejorar el emparejamiento en esta especificación.

**Tabla 3.** Todas las mutaciones presentadas en la presente son específicas de las

- 5 moléculas que contienen la cadena ligera lambda y se espera que funcionen como pares de carga lambda. Además, también se espera que los pares de carga opuesta [es decir, V134(D,E,S,T)-L128(R,K,H)] proporcionen un emparejamiento preferencial. La cadena lateral sin carga neta que contiene aminoácidos como la asparagina y la glutamina se puede usar para sustituciones con carga parcial positiva o negativa, ya que se ha
- 10 descubierto que participan en la formación de enlaces de hidrógeno con aminoácidos cargados tanto positiva como negativamente, así como entre sí.

| Conjunto | Cλ (+)       | CH1(-)         |
|----------|--------------|----------------|
| núm. 1   | V134 (R,K,H) | L128 (D,E,S,T) |
| núm. 2   | V134 (R,K,H) | L145 (D,E,S,T) |
| núm. 3   | L136 (R,K,H) | V185 (D,E,S,T) |
| núm. 4   | T117 (R,K,H) | V185 (D,E,S,T) |
| núm. 5   | T117 (R,K,H) | A141 (D,E,S,T) |
| núm. 6   | F119 (R,K,H) | L128 (D,E,S,T) |
| núm. 7   | Y178 (R,K,H) | V173 (D,E,S,T) |
| núm. 8   | V134 (R,K,H) | S183 (D,E,T)   |
| núm. 9   | T117 (R,K,H) | T187 (D,E)     |

Para la construcción de anticuerpos DuetMab con mutaciones del par de carga en la

- 15 interfaz cadena pesada-cadena ligera, se usaron como vectores principales los plásmidos

pDuet-Heavy y pDuet-Light descritos en (WO 2013/096291 y en Mazor et.al mAbs 2015).

Brevemente, el vector pDuet-Heavy contenía dos casetes de cadena pesada (HC)

gamma1 humana para soportar la heterodimerización de HC, donde la primera cadena

pesada portaba el conjunto de mutaciones de “ojal” (T366S/L368A/Y407V) y una mutación

estabilizadora (Y349C) en el dominio CH3, mientras que la última portaba la mutación

complementaria “botón” (T366W) y una mutación estabilizadora (S354C) en CH3, aunque

el orden de los casetes podía invertirse fácilmente. El vector pDuet-Light contenía dos

casetes de cadena ligera (LC) humana, donde la primera cadena ligera transportaba un

dominio constante kappa (C $\kappa$ ), mientras que la segunda transportaba un dominio

constante lambda (C $\lambda$ ). Los vectores pDuet-Heavy y pDuet-Light también contenían las

mutaciones para eliminar el enlace disulfuro intercadena nativo en CH1/C $\lambda$  y proporcionar

el enlace disulfuro alternativo que se denota como “V12 DS” o “V12” en esta

especificación, donde las mutaciones F126C/C220V se introdujeron en el dominio CH1 de

la cadena pesada “botón”, y las mutaciones S122C/C212V se introdujeron en el dominio

constante lambda. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes en las

estructuras de anticuerpos DuetMab ejemplificadas (antes de la introducción de

mutaciones de carga) se proporcionan de la siguiente manera:

Las mutaciones del conjunto “botón y ojal” y los enlaces disulfuro

estabilizadores/alternativos utilizados en la presente se proporcionaron simplemente como

un ejemplo. Un experto en la técnica puede usar cualquier otra combinación de mutaciones

para la técnica de “botón y ojal” y/o enlaces disulfuro estabilizadores/alternativos conocidos

en este campo para soportar la heterodimerización de HC.

Para la construcción del vector pDuet-Heavy con mutaciones de carga, la cadena pesada

“ojal” se clonó en el vector pDuet-Heavy mediante un fragmento de ADN sintetizado de los

dominios VH-CH1-CH2-CH3 que contenía las mutaciones antes mencionadas para la cadena

pesada “ojal” usando la técnica de clonación de restricción por BssHII/HindIII. Opcionalmente, la cadena pesada “ojal” contenía la mutación de carga S183K en el dominio CH1. La cadena pesada “botón” se clonó en el vector mediante un fragmento de ADN sintetizado de dominios VH-CH1-CH2-CH3 que contenía las mutaciones antes mencionadas para la cadena pesada

5 “botón” usando la técnica de clonación de restricción por BsrGI/EcoRI. Opcionalmente, la cadena pesada “Knob” contenía una de las mutaciones de carga en el dominio CH1: L128D, L128E, L128S, L128T, A141D, A141E, A141S, A141T, L145D, L145E, L145S, L145T, S183D, V185D, V185E, V185S, V185T, V173D, V173E, V173S, y V173T.

Para la construcción del pDuet-Light con mutaciones de carga, la cadena ligera kappa se

10 clonó en el vector pDuet-Light mediante un fragmento de ADN sintetizado de dominios VL-Ck usando la técnica de clonación de restricción por BssHII/NheI. Opcionalmente, el dominio kappa constante (Ck) contenía la mutación de carga V133E. La cadena ligera lambda se clonó en el vector pDuet-Light mediante un fragmento de ADN sintetizado de dominios VL-Cλ que contenían las mutaciones S122C/C212V antes mencionadas para la cadena ligera

15 lambda usando la técnica de clonación de restricción por BsrGI/EcoRI. Opcionalmente, el dominio lambda constante (Cλ) contenía una de las mutaciones de carga: V117R, V117K, F119R, F119K, V134R, V134K, L136R, L136K, Y178R e Y178K. El dominio variable de cadena ligera (VL) podría ser dominio kappa variable (Vk) o dominio lambda variable (Vλ).

Todos los constructos se expresaron transitoriamente en células CHO en suspensión

20 usando PEI-MAX (Polysciences, Inc., Warrington, PA) como reactivo de transfección y se cultivaron en un medio CHO realizado internamente. En estos estudios se usaron los vectores que contenían las siguientes combinaciones de pares de carga para la expresión de los anticuerpos. En la Figura 20 se proporciona un esquema de los DuetMabs

construidos que contienen pares de carga. La Tabla 4 a continuación proporciona detalles

25 de varios DuetMabs de pares de carga lambda dirigidos a CD3 y EGFR que se produjeron.

**Tabla 4.** Detalles de los DuetMabs EGFR/CD3 producidos que contienen pares de carga lambda

| Núm. de muestra | pDuet-Heavy        |       |                     |           | pDuet-Light         |       |                      |          |
|-----------------|--------------------|-------|---------------------|-----------|---------------------|-------|----------------------|----------|
|                 | Cadena pesada ojal |       | Cadena pesada botón |           | Cadena ligera Kappa |       | Cadena ligera Lambda |          |
|                 | Diana              | CH1   | Diana               | CH1 (V12) | Diana               | CL    | Diana                | CL (V12) |
| 1               | EGFR               | WT    | CD3                 | WT        | EGFR                | WT    | CD3                  | WT       |
| 2               | EGFR               | S183K | CD3                 | WT        | EGFR                | V133E | CD3                  | WT       |
| 33              | EGFR               | S183K | CD3                 | A141D     | EGFR                | V133E | CD3                  | T117R    |
| 34              | EGFR               | S183K | CD3                 | A141E     | EGFR                | V133E | CD3                  | T117R    |
| 35              | EGFR               | S183K | CD3                 | A141S     | EGFR                | V133E | CD3                  | T117R    |
| 36              | EGFR               | S183K | CD3                 | A141T     | EGFR                | V133E | CD3                  | T117R    |
| 41              | EGFR               | S183K | CD3                 | A141D     | EGFR                | V133E | CD3                  | T117K    |

El medio de cultivo se recogió de 7 a 13 días después de la transfección y se filtró a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu\text{m}$ . La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo se midió mediante un instrumento Octet384 usando sensores de proteína A (Sartorius, Göttingen, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los anticuerpos se purificaron mediante purificación por afinidad con perlas magnéticas de proteína A (Genscript, Piscataway, NJ) o cromatografía de afinidad de proteína A estándar (Cytiva, Marlborough, MA), seguida de cromatografía de afinidad de cadena ligera si fuera necesario, de acuerdo con el protocolo del fabricante, y posteriormente se intercambiaron el regulador en PBS (pH 7,2). La pureza y el estado oligomérico de las moléculas purificadas se determinaron mediante electroforesis basada en microfluídica y cromatografía de exclusión por tamaño analítica (ver los métodos a continuación). Se eliminaron los agregados de proteínas mediante SEC preparativa. Las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron leyendo la absorbancia a 280 nm usando coeficientes de extinción determinados teóricamente.

Se realizó un análisis SEC-HPLC (sistema HPLC Agilent 1260 Infinity) usando una columna TSK-gel G3000SWxL (Tosoh Biosciences, King of Prussia, PA) para determinar el estado oligomérico de las moléculas purificadas. Se realizó SEC-HPLC preparativa usando una columna Superdex 200 (Cytiva) para eliminar los agregados de proteínas.

5

Se realizó una electroforesis basada en microfluídica usando Bioanalyzer de acuerdo con el protocolo del fabricante (Agilent, Santa Clara, Ca), para evaluar la proporción de cadenas ligeras kappa y lambda de un anticuerpo, basado en el cálculo del porcentaje de proporción correcta de cadenas ligeras.

10

La Tabla 5 resume la expresión y los perfiles bioquímicos de variantes seleccionadas del par de carga en EGFR/CD3 DuetMabs. Las variantes del par de carga núm. 33, núm. 34, núm. 35, núm. 36, y núm. 41 mostraron una relación LC correcta mejorada en comparación con los controles núm. 1 y núm. 2.

15

**Tabla 5:** Sumario de la expresión y los perfiles bioquímicos de variantes del par de carga seleccionada en EGFR/CD3 DuetMabs.

| DuetMab  | Núm. de muestra | Brazo de ojal |       | Brazo de botón |          | Título (µg/ml)<br>Día 10/12 | % de relación<br>LC correcta | % de monómero |
|----------|-----------------|---------------|-------|----------------|----------|-----------------------------|------------------------------|---------------|
|          |                 | CH1           | Cκ    | CH1 (V12)      | Cλ (V12) |                             |                              |               |
| EGFR/CD3 | 1               | WT            | WT    | WT             | WT       | 364,2                       | 38,2                         | 94,8          |
|          | 2               | S183K         | V133E | WT             | WT       | 313,6                       | 66,4                         | 97,3          |
|          | 33              | S183K         | V133E | A141D          | T117R    | 289,9                       | 89,8                         | 96,5          |
|          | 34              | S183K         | V133E | A141E          | T117R    | 365,5                       | 93,6                         | 96,2          |
|          | 35              | S183K         | V133E | A141S          | T117R    | 262,7                       | 78,4                         | 97,4          |
|          | 36              | S183K         | V133E | A141T          | T117R    | 241,1                       | 79,2                         | 97,1          |
|          | 41              | S183K         | V133E | A141D          | T117K    | 252,7                       | 92,1                         | 97,1          |

Ejemplo 10 — Generación de anticuerpos biespecíficos 2+1 que contienen pares de carga lambda

El vector p2+1-Heavy se construyó sobre la estructura principal de pDuet-Heavy descrita en el

5 Ejemplo 9. Para la construcción del vector p2+1-Heavy con mutaciones de carga, la cadena pesada “ojal” se clonó en el vector mediante BssHII/HindIII como se describió anteriormente.

La cadena pesada “botón” fue clonada en el vector mediante un fragmento de ADN sintetizado de los dominios VH-CH1-VH-CH1-CH2-CH3 usando la técnica de clonación de restricción por BsrGI/EcoRI, donde el segmento VH-CH1 precedente correspondía a la

10 secuencia encontrada en la cadena pesada “ojal”, y el segmento VH-CH1 posterior contenía la VH contra otra diana así como la mutación de carga A141D y V12 DS en CH1. El vector pDuet-Light es común para los constructos Duet2 (2+1) Bispecific y DuetMab.

Todos los constructos biespecíficos Duet2 (2+1) se expresaron transitoriamente y se

15 purificaron como se describió anteriormente para las moléculas de DuetMab.

En la Figura 21 se proporciona un esquema del constructo Duet2 (2+1) que contiene pares de carga.

20 En la Tabla 6 se resume la expresión y los perfiles bioquímicos de las moléculas biespecíficas EGFR/CD3 y NIP228/CD3 Duet2 (2+1) portadoras de los conjuntos seleccionados de pares de carga producidos en cultivo celular de 500 ml. NIP228 es un dominio de unión de control no específico. Para un análisis adicional, los DuetMabs se purificaron aún más mediante cromatografía de afinidad de cadena ligera para eliminar los subproductos con errores de  
25 emparejamiento y los agregados se eliminaron mediante SEC preparativa.

**Tabla 6:** Producción de Duet2 (2+1) biespecífico con mutaciones de carga.

| Duet2 (2+1)<br>biespecífico | Antígeno<br>1/NIP228<br>(brazo de ojal) |                | Antígeno<br>1/NIP228<br>(brazo de<br>botón) |                | CD3 (brazo<br>de botón) |             | Título<br>(ug/ml) |           | Perfiles después de la<br>purificación de la<br>proteína A |                  | Perfiles de después de la<br>purificación de la cadena ligera |                  |                       |
|-----------------------------|-----------------------------------------|----------------|---------------------------------------------|----------------|-------------------------|-------------|-------------------|-----------|------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------|
|                             |                                         |                |                                             |                |                         |             | Día<br>7          | Día<br>14 | Relación<br>de Kappa<br>y Lambda                           | % de<br>monómero | Relación<br>de Kappa<br>y Lambda                              | % de<br>monómero | Endotoxina<br>(EU/mg) |
|                             | CH1                                     | C <sub>K</sub> | CH1                                         | C <sub>K</sub> | CH1<br>(V12)            | CA<br>(v12) |                   |           |                                                            |                  |                                                               |                  |                       |
| EGFR/CD3<br>2+1             | S183K                                   | V133E          | S183K                                       | V133E          | A141D                   | T117R       | 55                | 130       | 2,49:1                                                     | 90               | 2:1                                                           | >99              | <0,5                  |
| NIP228 /CD3<br>2+1          | S183K                                   | V133E          | S183K                                       | V133E          | A141D                   | T117R       | 96                | 380       | 2,39:1                                                     | 91               | 1,9:1                                                         | >99              | <0,5                  |

En la Tabla 7 se resumen las estabilidades térmicas de las moléculas biespecíficas

- 5 EGFR/CD3 y NIP228/CD3 Duet2 (2+1) mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF) y sus perfiles de estabilidad acelerada. Las moléculas biespecíficas Duet2 (2+1) no mostraron indicadores de agregación o fragmentación después del estrés por calor.

**Tabla 7:** Sumario de capacidad de desarrollo de Duet2 (2+1) biespecífico con

10 mutaciones de carga

| Duet2 (2+1)<br>biespecífico | Estabilidad acelerada (45 °C, 14d) |                            |                             |                         | DSF                 |                |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------|----------------|
|                             | Pérdida de<br>monómero<br>(%)      | Aumento de<br>agregado (%) | Aumento de<br>fragmento (%) | ΔRT de<br>NIP228<br>(m) | T <sub>inicio</sub> | T <sub>m</sub> |
| EGFR/CD3 2+1                | 6,18                               | 0,30                       | 5,87                        | 6,18                    | 50                  | 60,6           |
| NIP228 /CD3 2+1             | 3,19                               | 0,69                       | 2,49                        | 3,19                    | 47                  | 58,3           |

La Tabla 8 muestra los datos del espectro de masas de subunidades de las moléculas biespecíficas EGFR/CD3 y NIP228/CD3 Duet2 (2+1). La alineación de la masa teórica y la masa medida confirmaron la integridad de la molécula y la identidad de asociación

15 LC/HC de cada variante.

**Tabla 8:** Resultados MS del análisis de subunidad LC/MS.

| EGFR/<br>CD3 2+1                                                         | Masa medida | Masa teórica |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|
| Fc con 2 G0F                                                             | 53095       | 53095        |
| Antígeno 1 LC + Antígeno 1 HC Fab (brazo de ojal)                        | 47545       | 47544        |
| Antígeno 1 LC + Antígeno 1 HC Fab + CD3 LC + CD3 HC Fab (brazo de botón) | 95876       | 95876        |
|                                                                          |             |              |
| NIP228/<br>CD3 2+1                                                       | Masa medida | Masa teórica |
| Fc con 2 G0F                                                             | 53095       | 53095        |
| NIP228-LC + NIP228 HC Fab (brazo de ojal)                                | 46991       | 46991        |
| NIP228 LC + NIP228 HC Fab + CD3 LC + CD3 HC Fab (brazo de botón)         | 95322       | 95322        |

La Tabla 9 muestra los estudios de estabilidad térmica de las moléculas biespecíficas

- 5 EGFR/CD3 y NIP228/CD3 Duet2 (2+1) usando análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). La Tabla 14 enumera los valores de  $T_M$  deconvolucionada y  $T_{inicio}$  aproximados de moléculas biespecíficas Duet2 (2+1).

**Tabla 14:** Resultados MS del análisis de subunidad LC/MS.

| Nombre                 | $T_{M1}$ (°C) | $T_{M2}$ (°C) | $T_{M3}$ (°C) | $T_{inicio}$ aproximado (°C) $\pm$ S.D. |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------------------|
| EGFR/CD3 Duet2 (2:1)   | 64,6          | 70,5          | 79,0          | 51,8 $\pm$ 0,4                          |
| NIP228/CD3 Duet2 (2:1) | 66,7          | 71,8          | 79,3          | 53 $\pm$ 1,3                            |

10

Las moléculas biespecíficas EGFR/CD3 Duet2 (2+1) se probaron en un ensayo de citotoxicidad que contenía células T y células diana que expresaban EGFR y células T CD8 y CD4 activadas, lo que demuestra que este Duet2 (2+1) es funcional.

Ejemplo 11 — Generación de anticuerpos triespecíficos que contienen pares de carga  $\lambda$  y  $\kappa$

El vector pTriMab-Heavy se construyó sobre la estructura principal de pDuet-Heavy descrita en el Ejemplo 9 anterior. Para la construcción del vector pTriMab-Heavy con mutaciones de carga, la cadena pesada “ojal” se clonó en el vector mediante BssHII/HindIII como se describió anteriormente, donde el segmento VH-CH1 en la cadena pesada “ojal” se definió como “Fab1” con el VH contra una primera diana y la mutación de carga S183K en CH1. La cadena pesada “botón” se clonó en el vector mediante un fragmento de ADN sintetizado de los dominios VH-CH1-VH-CH1-CH2-CH3 usando la técnica de clonación de restricción por BsrGI/EcoRI. El segmento VH-CH1 anterior de la cadena pesada “botón” se definió como “Fab2” con el VH contra una segunda diana, así como la mutación de carga S183E y, opcionalmente, el V12 DS en CH1. El segmento VH-CH1 posterior de la cadena pesada “botón” se definió como “Fab3” con el VH contra una tercera diana, así como la mutación de carga A141D y el V12 DS en CH1.

Los vectores pTriMab-Light1 y pTriMab-Light2 se construyeron en la estructura principal de pDuet-Light descrita en el Ejemplo 1 anterior. Para la construcción del pTriMab-Light1 con mutación de carga, la cadena ligera kappa de Fab1 se clonó en el vector por BssHII/NheI como se describió anteriormente, donde el dominio Ck contenía la mutación de carga V133E. Se eliminó el segundo casete LC ( $\lambda$ ) en pTriMab-Light1.

Para la construcción del pTriMab-Light2 con mutaciones de carga, la cadena ligera kappa de Fab2 se clonó en el vector por BssHII/NheI como se describió anteriormente, donde el dominio Ck contenía la mutación de carga V133K y opcionalmente el V12 DS (S121C/C214V para Ck). La cadena ligera  $\lambda$  de Fab3 se clonó en el vector por

BsrGI/EcoRI como se describió anteriormente, donde el dominio C $\lambda$  contenía la mutación de carga T117R y el V12 DS.

Todos los constructos de TriMab se expresaron transitoriamente y se purificaron como se describió anteriormente para las moléculas de DuetMab. En la Figura 22 se proporciona un esquema de los TriMab construidos que contienen pares de carga.

La Tabla 15 resume la expresión y los perfiles bioquímicos del TriMab EGFR/Her2/CD3 portando los conjuntos seleccionados de pares de carga producidos en cultivo celular de 500 ml. Para análisis adicionales, los TriMabs se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de afinidad de proteína A, y los agregados se eliminaron mediante columna CHT preparativa (un medio de cromatografía de modo mixto incompresible usando intercambio catiónico e interacciones de afinidad por calcio).

**Tabla 15:** EGFR/Her2/CD3 TriMab trispecífico con mutaciones de carga. La relación de kappa y lambda se calculó por densidad de banda a partir de electroforesis en gel capilar en condiciones reductoras usando Agilent Protein 80 Chip. El contenido de monómero se calculó mediante cromatograma analítico de exclusión por tamaño del intacto. La hidroxiapatita cerámica CHT es un método de purificación de modo mixto.

| TriMab                  | Fab1-HER2<br>(brazo de ojal) |            | Fab2-EGFR-<br>(brazo de botón) |                  | Fab3-CD3<br>(brazo de botón) |                      | Título<br>( $\mu$ g/ml) | Perfiles después de la<br>purificación de la<br>proteína A |                  | Perfiles de después de<br>CHT    |                  |
|-------------------------|------------------------------|------------|--------------------------------|------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|
|                         | CH1                          | C $\kappa$ | CH1(v12)                       | C $\kappa$ (v12) | CH1<br>(v12)                 | C $\lambda$<br>(v12) | Día 12                  | Relación<br>de Kappa y<br>Lambda                           | % de<br>monómero | Relación<br>de Kappa y<br>Lambda | % de<br>monómero |
| EGFR/HER2<br>CD3 TriMab | S183K                        | V133E      | S183E                          | V133K            | A141D                        | T117R                | 176                     | 2,12                                                       | 95               | 2,41                             | >99              |

La Tabla 16 resume las estabilidades térmicas del TriMab EGFR/Her2/CD3 mediante fluorimetría de barrido diferencial (DSF) y sus perfiles de estabilidad acelerada. La molécula TriMab EGFR/Her2/CD3 no mostró indicadores de agregación o fragmentación después del estrés por calor.

5

**Tabla 16:** Sumario de capacidad de desarrollo de TriMab EGFR/Her2/CD3 con mutaciones de carga. La relación de kappa y lambda se calculó por densidad de banda a partir de electroforesis en gel capilar en condiciones reductoras usando Agilent Protein 80 Chip. El contenido de monómero se calculó mediante cromatograma analítico de exclusión por tamaño del intacto.

10

| Nombre de la molécula | Calor de estabilidad acelerada (45 °C, 14d) |                         |                          | DSF                 |                          |
|-----------------------|---------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|
|                       | Pérdida de monómero (%)                     | Aumento de agregado (%) | Aumento de fragmento (%) | T <sub>m</sub> (°C) | T <sub>inicio</sub> (°C) |
| EGFR/HER2 CD3 TriMab  | 2,21                                        | 0                       | 2,21                     | 60,6                | 54,1                     |

En la Tabla 17 se reportan los datos del espectro de masas de subunidades de TriMab EGFR/Her2/CD3. La alineación de la masa teórica y la masa medida confirmaron la integridad de la molécula y la identidad de asociación LC/HC de cada pico.

15

**Tabla 17:** Resultados de MS del análisis LC/MS de subunidades de TriMab EGFR/Her2/CD3.

| pico | Masa medida (Da) | Masa teórica (Da) | Anotación                     |
|------|------------------|-------------------|-------------------------------|
| 1    | 23588            | 23589             | Antígeno 2 LC+Cys             |
| 2    | 53096            | 53096             | Fc (2xG0F)                    |
|      | 53126            | 53128             | Fc (2xG0F)+Trisulfuro         |
| 3    | 50205            | 50205             | Fc (sin glicano)              |
|      | 51650            | 51650             | Fc (1xG0F)                    |
| 4    | 100680           | 100677            | Fab (Antígeno 2)+Fc           |
|      | 100710           | 100709            | Fab(Antígeno 2)+Fc+Trisulfuro |

|   |        |        |                                   |
|---|--------|--------|-----------------------------------|
| 5 | 47599  | 47599  | Fab(Antígeno 2)                   |
| 6 | 148953 | 148951 | Fab(Antígeno 1-CD3)+Fc+Trisulfuro |
| 7 | 95842  | 95841  | Fab(Antígeno 1-CD3)               |

En la Tabla 18 se reportan los estudios de estabilidad térmica del TriMab EGFR/Her2/CD3 usando análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y enumera los valores de  $T_m$  deconvolucionados y  $T_{inicio}$  aproximados del TriMab EGFR/Her2/CD3.

5

**Tabla 18:** Las mediciones de termoestabilidad DSC capturaron transiciones para los dominios Fab, CH1, CH2 y CH3 bajo las descripciones  $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$ , y  $T_{m3}$ . Algunas transiciones se suman en la misma transición de pico  $T_m$

| Nombre:              | $T_{m1}$ (°C) | $T_{m2}$ (°C) | $T_{m3}$ (°C) | Entalpía total (kcal/mol) FIO | $T_{inicio}$ aproximado (°C) $\pm$ S.D. |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------------------|
| EGFR/HER2 CD3 TriMab | 64,0          | 68,3          | 77,0          | 1549,74                       | 49,6 $\pm$ 3,1                          |

10 Las moléculas TriMab EGFR/Her2/CD3 se probaron en un ensayo de citotoxicidad que contenía células T y células positivas solo para EGFR (células “monopositivas”) o positivas tanto para EGFR como para HER2 (células “doble positivas”). El TriMab EGFR/Her2/CD3 mostró muerte celular, activación de las células T CD8 y CD4 tanto de células monopositivas como doble positivas, lo que demuestra que este formato TriMab es funcional.

15