AGENTES DE UNIÓN A ENPP3 Y CD3 Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/531.157, presentada el 7 de agosto de 2023, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presenta electrónicamente en formato XML y que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. La copia XML, creada el 29 de julio de 2024, se denomina JBI6827WOPCT1_SL.xml y su tamaño es de 290 kilobytes.

1. CAMPO

La presente descripción se relaciona generalmente a un acoplador de células T que se une al miembro 3 de la familia antiectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP3) y al grupo de diferenciación 3 (CD3), composiciones que comprenden los mismos y métodos para usarlos.

2. ANTECEDENTES

Los tumores sólidos han sido un desafío para la terapia de redirección de células T mediada por anticuerpos, con fármacos muy limitados, si es que hay alguno, aprobados todavía por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los EE. UU. La limitación del enfoque puede estar relacionada con la falta de especificidad del cáncer de las dianas, lo que lleva a que se produzca toxicidad en dosis subeficaces. La necesidad no cubierta sigue existiendo en los tumores sólidos para prolongar y mejorar los resultados y la duración general del tratamiento.

Existe la necesidad de enfoques innovadores para dirigirse efectivamente a los tumores sólidos y minimizar las toxicidades del tratamiento. La presente descripción cumple con estas y otras necesidades.

3. SUMARIO

En un aspecto, en la presente se proporciona un agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une a un epítopo de ENPP3. En algunas modalidades, el epítopo de ENPP3 se selecciona del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.:295-297, DVP y sec. con núm. de ident.:299-305.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno comprende un dominio VH y VL seleccionado del grupo que consiste en: (a) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:23;(b) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en

la sec. con núm. de ident.:45, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:46; (c) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:69 o sec. con núm. de ident.:70; (d) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:92; (e) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:114 o sec. con núm. de ident.:115; (f) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:135 o sec. con núm. de ident.:136; (g) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:159; y (h) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:178.

En algunas modalidades, las secuencias de CDR se seleccionan del grupo que consiste en: (a1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (a2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:7, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:8, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (a3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (a4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.

con núm. de ident.:14, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16; (a5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:17, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (b1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:25, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (b2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:30, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:31, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (b3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:32, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:33, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (b4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:34, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:35, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:36, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:37, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:38, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:39; (b5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:40, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:41, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:42, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:43, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (c1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:47, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:48, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (c2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:53, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:54, la

HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (c3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:55, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:56, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (c4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:57, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:58, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:59, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:60, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:61, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:62; (c5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:63, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:64, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:65, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:66, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de QIS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (d1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:71, la HCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:72, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (d2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:77, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:78, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (d3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:79, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:80, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (d4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:81, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:82, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:83, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:84, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:85, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86; (d5) la HCDR1 comprende

la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:87, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:88, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:89, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:90, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (e1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:93, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:94, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (e2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:99, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:100, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (e3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:101, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:102, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (e4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:103, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:104, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:105, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:106, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:107, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:108; (e5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:109, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:110, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:111, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:112, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (f1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:116, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:117, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (f2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:121, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:122, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (f3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:123, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:124, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (f4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:125, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:126, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:127, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:128, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:129; (f5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:130, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:131, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:132, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:133, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (g1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:137, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:138, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; (g2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:143, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:144, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; (g3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:145, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:146, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; (g4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:147, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:148, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:149, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:150, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:151, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:152; (g5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:153, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:154, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:155, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:156, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de AAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; (h1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:160, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (h2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:164, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:165, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (h3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:166, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:167, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (h4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:168, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:169, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:170, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:171, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86; y (h5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:172, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:173, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:174, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:175, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de VAS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno comprende un dominio VH y un dominio VL seleccionados del grupo que consiste en: (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23;(b) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46; (c) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69; (c) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70; (d) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que

comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92; (e) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114; (e') un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115;(f) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135; (f') un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:136; (g) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159; y (h) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178.

En algunas modalidades, el agente de unión es una proteína biespecífica o una proteína multiespecífica.

En algunas modalidades, el agente de unión comprende además una región constante de la inmunoglobulina (Ig), o un fragmento de la región constante de la Ig, en donde opcionalmente el fragmento de la región constante de la Ig es una región Fc o un dominio CH3. En algunas modalidades, la región constante de Ig, el fragmento de la región constante de Ig, la región Fc o el dominio CH3 comprende al menos una mutación. En algunas modalidades, la al menos una mutación se selecciona del grupo

que consiste en L234A/L235A/D265S, F234A/L235A, L234A/L235A, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-eliminado/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S and S228P/F234A/L235A/G236-eliminado/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, la al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en T366S/L368A/Y407V, T366W, T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366L, F405W, T394W, K392L, T394S, Y407T, Y407A, , L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366A/K409F, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V y T350V/T366L/K392L/T394W, en donde la numeración de residuos está de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, el agente de unión comprende mutaciones de botón en ojal, en donde las mutaciones de botón comprenden T366S/L368A/Y407V, y la mutación de ojal comprende T366W.

En algunas modalidades, el agente comprende una proteína biespecífica que comprende una región de unión al antígeno que se une a un segundo antígeno distinto de ENPP3. En algunas modalidades, el segundo antígeno es un cúmulo de diferenciación 3ε (CD3ε).

En algunas modalidades, el agente de unión comprende una primera región de unión al antígeno que se une a ENPP3 y una segunda región de unión al antígeno que se une a CD3ε, en donde la primera región de unión al antígeno que se une a

ENPP3 comprende una VH y una VL seleccionadas del grupo que consiste en: (a) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:23; (b) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:45, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:46; (c) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:69 o sec. con núm. de ident.:70; (d) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:92; (e) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:114 o sec. con núm. de ident.:115; (f) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:135 o sec. con núm. de ident.:136; (g) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL

como se establece en la sec. con núm. de ident.:159; y (h) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:178.

En algunas modalidades, la segunda región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:201.

En algunas modalidades, la primera región de unión al antígeno que se une a ENPP3 comprende secuencias CDR seleccionadas del grupo que consiste en: (a1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;(a2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:7, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:8, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (a3) la

HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (a4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:14, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16; (a5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:17, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (b1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:25, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (b2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:30, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:31, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (b3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:32, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:33, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (b4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:34, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:35, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:36, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:37, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:38, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:39; (b5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:40, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:41, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:42, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:43, la LCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de DAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29; (c1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:47, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:48, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (c2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:53, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:54, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (c3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:55, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:56, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (c4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:57, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:58, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:59, la LCDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:60, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:61, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:62; (c5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:63, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:64, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:65, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:66, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de QIS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52; (d1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:71, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:72, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (d2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:77, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:78, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (d3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:79, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:80, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;(d4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:81, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:82, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:83, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:84, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:85, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86; (d5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:87, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:88, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:89, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:90, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (e1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:93, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:94, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (e2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:99, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:100, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (e3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:101, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:102, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (e4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:103, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:104, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:105, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:106, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:107, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:108; (e5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:109, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:110, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:111, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:112, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98; (f1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:116,

la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:117, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (f2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:121, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:122, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (f3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:123, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:124, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (f4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:125, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:126, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:127, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:128, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:129;

(f5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:130, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:131, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:132, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:133, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120; (g1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:137, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:138, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; (g2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:143, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:144, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; (g3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:145, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:146, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; (g4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:147, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:148, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:149, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:150, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:151, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:152; (g5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:153, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:154, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:155, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:156, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de AAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142; la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:160, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:164, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:165, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la

LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; (h3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:166, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:167, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76; la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:168, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:169, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:170, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:171, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86; y (h5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:172, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:173, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:174, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:175, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de VAS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades, la segunda región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en: (a) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:179, la

HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:180, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; y (b) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:185, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:186, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; (c) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:187, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:188, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; o (d) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:189, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:190, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:191, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:192, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:193, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:194; y (e) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:195, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:196, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:197, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:198, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184.

En algunas modalidades, (i) la primera región de unión al antígeno comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23; y (ii) la segunda región de unión al antígeno comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:201.

En algunas modalidades, la primera región de unión al antígeno comprende un Fab, y la segunda región de unión al antígeno comprende un fragmento scFv engrapado (spFv). En algunas modalidades, el spFv comprende al menos un enlace disulfuro entre la VH o VL y el enlazador.

En algunas modalidades, el agente de unión comprende además una región constante de la inmunoglobulina (Ig), un fragmento de la región constante de la Ig, en donde opcionalmente el fragmento de la región constante de la Ig es una región Fc o un dominio CH3.

En un aspecto, en la presente se proporciona un agente de unión que comprende (i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a CD3ε, un

dominio CH2 y un dominio CH3; (ii) un segundo polipéptido que comprende un dominio VH que se une a ENPP3, un dominio CH2 y un dominio CH3; y (iii) un tercer polipéptido que comprende un dominio VL que se une a ENPP3, en donde el spFv que se une a CD3ε comprende un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:201; y en donde el segundo y tercer polipéptido comprenden una VH y una VL que se unen a ENPP3, en donde las VH y VL que se unen a ENPP3 se seleccionan del grupo que consiste en: (a) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:23; (b) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:45, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:46; (c) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:69 o sec. con núm. de ident.:70; (d) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:92; (e) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio

VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:114 o sec. con núm. de ident.:115; (f) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:135 o sec. con núm. de ident.:136; (g) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:159; y (h) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:178.

En algunas modalidades, (i) el spFv que se une a CD3ε comprende CDR seleccionadas del grupo que consiste en: (a) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:179, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:180, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; (b) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:185, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:186, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; (c) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:187, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:188, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; (d) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:189, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:190, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:191, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:192, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:193, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:194; y (e) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:195, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:196, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:197, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:198, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; y (ii) el Fab que se une a ENPP3 comprende: (a) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:2; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (b) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:7; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:8; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (c) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6; (d) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:14; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16; y (e) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:17; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6.

En algunas modalidades, el spFv que se une a CD3ε comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:201; el dominio VH que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y el dominio VL que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23.

En algunas modalidades, el spFv que se une a CD3ε comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:248; el dominio VH que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y el dominio VL que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23.

En algunas modalidades, (i) el primer polipéptido que comprende un spFv que se une a CD3ε, un dominio CH2 y un dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:255; (ii) el segundo polipéptido que

comprende un dominio VH que se une a ENPP3, un dominio CH2 y un dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:256; y (iii) el tercer polipéptido que comprende un dominio VL que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:257.

En algunas modalidades, el spFv comprende al menos un enlace disulfuro entre la VH o VL y el enlazador.

En un aspecto, en la presente se proporciona una composición que comprende cualquiera de los agentes de unión descritos en la presente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, en la presente se proporciona un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una VH, una VL, o tanto una VH como una VL de cualquiera de los agentes de unión descritos en la presente.

En un aspecto, en la presente se proporciona un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente.

En un aspecto, en la presente se proporciona una célula que comprende cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. En un aspecto, en la presente se proporciona una célula que comprende cualquiera de los vectores descritos en la presente. En un aspecto, en la presente se proporciona una célula aislada que produce cualquiera de los agentes de unión descritos en la presente.

En un aspecto, en la presente se proporciona un kit que comprende cualquiera de los agentes de unión descritos en la presente.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para preparar un agente de unión que se une a un epítopo de ENPP3, que comprende cultivar la célula

descrita en la presente para expresar el agente de unión. En un aspecto, en la presente se proporciona un método para preparar un agente de unión que se une a un epítopo de ENPP3, que comprende expresar un polinucleótido descrito en la presente.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para dirigir una célula T a una célula diana que expresa ENPP3, que comprende poner en contacto la célula T con una cantidad efectiva de un agente de unión a ENPP3xCD3 descrito en la presente o una composición que comprende el agente de unión a ENPP3xCD3 y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3ε se une a la célula T y la región de unión al antígeno que se une a ENPP3 se une a la célula diana.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar un cáncer o tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente de unión a ENPP3xCD3 descrito en la presente o una composición que comprende el agente de unión a ENPP3xCD3 y un portador farmacéuticamente aceptable al sujeto. En algunas modalidades, el cáncer o tumor se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC, por sus siglas en inglés), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa el embudo de detección que se utilizó para detectar los aglutinantes de ENPP3.

La Figura 2 representa la destrucción *in vitro* con los anticuerpos seleccionados. La imagen se recopila de Incucyte. Solo se seleccionó la capa Roja con la escala establecida en 1,0 min y 3,0 máx. El ensayo se ejecutó en una relación de efector a diana de 3:1. La serie de titulación triple comenzó con 3 µg/ml. Hubo una pérdida de células con compuestos activos.

La Figura 3 representa un transcurso del tiempo de destrucción *in vitro* con anticuerpos seleccionados. El curso temporal se realizó con un tratamiento de 0,04 y 2,5 µg/ml. El anticuerpo B56 mostró la mejor destrucción con dosis bajas en las tres líneas celulares que expresan ENPP3.

La Figura 4 representa resultados experimentales ilustrativos que muestran la pérdida de área tumoral.

La Figura 5 representa resultados experimentales ilustrativos que muestran el curso de tiempo del cambio en cantidad de veces del AUC del área tumoral. Los gráficos muestran los resultados con las moléculas ENPP3xCD3W245. Los gráficos muestran el cambio en cantidad de veces del AUC del área tumoral a lo largo del tiempo en dos concentraciones (0,04 y 1 µg/ml) para cada línea celular analizada. A medida que se produce la destrucción, el área disminuye. La tabla muestra el valor promedio a las 72 horas para cada compuesto en las dos concentraciones. A mayores concentraciones el valor es menor. NPP3B276, NPP3B314 y NPP3B321 siguen activos en dosis más bajas. El área del tumor no disminuye en las células ENPP3 HEPG2 KO. Los brazos de

referencia nulos CD3 (ENPP3-Ref1 y ENPP3-Ref2) no estaban activos en los brazos que expresan ENPP3. Las células A704 tienen más receptores que HEPG2.

La **Figura 6** representa resultados experimentales ilustrativos que muestran el % de pérdida tumoral a las 72 horas en ratones portadores de tumores de xenoinjerto (ya sea A704 o HEPG2) y tratados con anticuerpos biespecíficos ENPP3xCD3W245.

La **Figura 7** representa resultados experimentales ilustrativos que muestran que ENPP3xCD3 seleccionados exhiben una potente destrucción *in vitro* y activación de células T.

La **Figura 8** representa resultados experimentales ilustrativos que muestran que ENPP3xCD3 seleccionados exhiben una potente destrucción *in vitro* incluso en relaciones E:T más bajas.

La **Figura 9** representa resultados experimentales ilustrativos que muestran que la unión superficial de ENPP3 es específica de líneas celulares que expresan ENPP3. Los datos muestran reactividad cruzada con otros miembros de la familia ENPP3 para los 3 aglutinantes principales.

La **Figura 10** representa resultados experimentales ilustrativos que muestran que moléculas ENPP3xCD3 seleccionadas demostraron una sólida eficacia antitumoral en el modelo VMRC-RCW CDX humanizado con células T.

La **Figura 11** representa resultados experimentales ilustrativos que muestran que los volúmenes tumorales individuales demuestran eficacia con NPP3B56xCD3B2030-N106A.

La **Figura 12** representa una tabla que demuestra la eficacia de las moléculas ENPP3xCD3 en xenoinjertos de HepG2 en ratones NSG hembra

humanizadas con células T. Diseño del estudio: Inyectar 5e6 células/animal + 50 % Matrigel/animal. Aleatorizar en grupos cuando los tumores miden ~50-150 mm^3 ~16-21 días después de la implantación. 20e6 células T del donante D204071 se inyectaron IP el día después de la aleatorización. Los anticuerpos se dosificaron IP 2 veces por semana después del día de tratamiento con IVIG y Fc Block después de la inyección de células T durante 3 semanas. Los tumores se midieron con calibradores una vez por semana hasta que el volumen tumoral medio del grupo alcanzó aproximadamente 1500 mm^3 y el peso corporal se tomó dos veces por semana. Muestreo de sangre en serie de sangre completa recolectada a través de la vena de la cola en tubos con EDTA (10-15 µl) y diluida 1:10 en regulador a las 4, 24, 72 horas después de la primera dosis y 24 y 72 horas después de la última dosis. Las muestras se almacenan a -80 hasta que se recolectan todas las muestras y después se envían para bioanálisis.

La **Figura 13** representa resultados experimentales ilustrativos que demuestran que el tratamiento con NPP3B194 a 1 y 5 mg/kg y NPP3B239 a 1 y 10 mg/kg muestra una regresión tumoral significativa en ratones NSG el día 52.

La **Figura 14** representa resultados experimentales ilustrativos que demuestran que los gráficos de tumores medios muestran respuestas antitumorales sostenidas en grupos tratados con NPP3B194 a 1 y 5 mg/kg y NPP3B239 a 1 y 10 mg/kg en comparación con el control CD3xNull en ratones NSG que portan tumores de xenoinjerto HepG2.

La **Figura 15** representa resultados experimentales ilustrativos que demuestran que los volúmenes tumorales individuales muestran respuestas completas en los grupos tratados con NPP3B194 a 1 y 5 mg/kg, y NPP3B239 a 1 y 10 mg/kg el día 61.

La **Figura 16** representa datos ilustrativos que muestran el mapeo de epítopos HDX-MS de NPP3W6 contra tres mAb. Los epítopos contra NPP3B56 son los residuos 412-415 (PHDF; sec. con núm. de ident.:295), 673-676 (PSES; sec. con núm. de ident.:296), 762-768 (PDEITKH; sec. con núm. de ident.:297), y 773-775 (DVP). Los epítopos contra NPP3B62 son los residuos 572-576 (SLECF; sec. con núm. de ident.:299), 582-586 (NSTQL; sec. con núm. de ident.:300), y 673-681 (PSESQKCSF; sec. con núm. de ident.:301). Los epítopos contra NPP3B98 son los residuos 556-562 (VSKFSVC; sec. con núm. de ident.:302), 612-616 (RPRVL; sec. con núm. de ident.:303), 621-624 (DHCL; sec. con núm. de ident.:304) y 856-860 (QPVSE; sec. con núm. de ident.:305). La Figura describe la sec. con núm. de ident.: 327.

La **Figura 17** muestra un esquema de **NPP3B815 (NPP3B56xCD3B2030-N106A)** , un anticuerpo biespecífico dirigido a CD3 y ENPP3. AAS, L234A, L235A, D265S; CD, cúmulo de diferenciación; Fab, unión al antígeno de fragmento; ojal, T366S, L368A, Y407V; botón, T366W; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Ig, inmunoglobulina; spFv, variable de fragmento monocatenario engrapado.

La **Figura 18** muestra la expresión de ENPP3 (densidad de receptores) en diferentes líneas celulares cancerosas con niveles de expresión variables. Detección de ENPP3 de membrana basada en citometría de flujo y cuantificación de la ocupación del receptor medida usando un anticuerpo ENPP3 comercial (es decir, clon NP4D6) en un panel de líneas celulares de cáncer endógeno. Histograma representativo que muestra la expresión de ENPP3 en una línea celular alta, media y negativa. Abreviaturas: ABC, capacidad de unión de anticuerpos; ENPP3, miembro 3

de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; HCC, carcinoma hepatocelular; LD, vivo muerto; LLOD: límite inferior de detección; Med, medio; Neg, negativo; RCC, carcinoma de células renales; ULOD, límite superior de detección.

La **Figura 19** muestra la expresión de ENPP3 en diferentes sistemas modelo CDX y PDX in vivo de tumores ex vivo. Citometría de flujo (usando el clon de anticuerpo comercial NP4D6) y evaluación basada en IHC (usando el clon de anticuerpo comercial E5M2W) de la expresión de ENPP3 en 2 modelos CDX, es decir, VMRCRCW (RCC) y HepG2 (HCC), y un modelo RCC PDX, es decir, RXF488. La ampliación es de 30X para todas las imágenes. Abreviaturas: ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; CDX, xenoinjerto derivado de línea celular; HCC, carcinoma hepatocelular; IHC, inmunohistoquímica; LD, vivo muerto; PDX: xenoinjerto derivado del paciente; RCC, carcinoma de células renales.

Las **Figuras 20A y 20B** muestran la unión de **NPP3B815** a líneas celulares tumorales endógenas que expresan ENPP3 y células T aisladas. La **Figura 20A** muestra la unión de ENPP3xCD3 (NPP3B815) y NullxCD3 (CD3B2533) en líneas celulares A704 (ENPP3-alta), VMRCRCW (ENPP3-media) y HepG2 ENPP3KO (ENPP3-negativa) se evaluó mediante citometría de flujo. La **Figura 20B** muestra la unión de anticuerpos de ENPP3xCD3 (NPP3B815, **NPP3B815**) y de control de isotipo (79C3B613) evaluados mediante citometría de flujo en células T aisladas de 6 donantes humanos sanos diferentes. Las líneas continuas indican **NPP3B815** y las líneas punteadas (parte inferior del gráfico) indican la unión de 79C3B613. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; geomedia, media geométrica.

La **Figura 21** muestra la unión de NPP3B815 a líneas celulares que sobreexpresan ENPP1, ENPP2 y ENPP3. La unión de ENPP3xCD3 (**NPP3B815**) y el control de isotipo (79C3B613) en la línea celular parental CHO o en líneas celulares CHO que sobreexpresan ENPP1, ENPP2 o ENPP3 se evaluó mediante citometría de flujo. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; ENPP1, miembro 1 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; ENPP2, miembro 2 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa.

La **Figura 22** muestra la destrucción de células tumorales inducida por NPP3B815 de un panel de líneas celulares tumorales con expresión endógena de ENPP3. La evaluación basada en Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para rojo Nuclight) se midió tras el tratamiento con anticuerpos ENPP3xCD3 (NPP3B815, **NPP3B815**), ENPP3xNull (NPP3B812) y NullxCD3 (79C3B615) en presencia de células T aisladas del donante 888668965 en una relación E:T de 3:1 en un panel de líneas celulares. Datos representados a las 72 horas después del tratamiento. Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana; SEM, error estándar de la media.

La **Figura 23** muestra la activación de células T inducida por **NPP3B815** en un panel de líneas celulares tumorales con expresión endógena de ENPP3. La activación de las células T (es decir, células T CD25+) se midió mediante citometría de flujo tras el tratamiento con anticuerpos ENPP3xCD3 (NPP3B815, **NPP3B815**), ENPP3xNull (NPP3B812) y NullxCD3 (79C3B615) durante 48 horas en presencia de

células T aisladas del donante 888668965 a una relación E:T de 3:1 con líneas celulares A704 (ENPP3-alta), VMRCRCW (ENPP3-media), HepG2 (ENPP3-media) y HepG2 ENPP3 KO (ENPP3-negativa). Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana.

Las **Figuras 24A y 24B** muestran la destrucción de células tumorales inducida por **NPP3B815** y la activación de células T en presencia de células T aisladas de múltiples donantes en líneas celulares positivas a ENPP3 y negativas a ENPP3. (**Figura 24A**) Evaluación basada en Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para rojo Nuclight) medida tras el tratamiento con anticuerpo ENPP3xCD3 (**NPP3B815**) en presencia de células T (relación E:T de 3:1). aisladas de 6 donantes humanos sanos diferentes probados con líneas celulares A704 (ENPP3-alta), VMRCRCW (ENPP3-media) y HepG2 ENPP3 KO (ENPP3-negativa). Datos representados a las 72 horas después del tratamiento. Las barras de error son SEM. (**Figura 24B**) La activación de las células T (es decir, células T CD25+) se midió mediante citometría de flujo tras el tratamiento con ENPP3xCD3 (**NPP3B815**) durante 48 horas en presencia de células T (relación E:T de 3:1) aisladas de 6 donantes humanos sanos diferentes probados con líneas celulares A704 (ENPP3-alta), VMRCRCW (ENPP3-media) y HepG2 ENPP3 KO (ENPP3-negativa). Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana; SEM, error estándar de la media.

Las **Figuras 25A y 25B** muestran la destrucción de células tumorales inducida por **NPP3B815** en presencia de células T aisladas de múltiples donantes en diferentes relaciones E:T. (**Figura 25A)** Evaluación basada en Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para rojo Nuclight) medida tras el tratamiento con ENPP3xCD3 (**NPP3B815**) en presencia de células T aisladas de 6 donantes humanos sanos diferentes y añadidas en 2 diferentes relaciones E:T de 1:1 y 1:3 al ensayo con la línea celular ENPP3-alta, A704. Datos representados a las 72 y 120 horas después del tratamiento. Las barras de error son SEM. (**Figura 25B**) Evaluación basada en Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para rojo Nuclight) medida durante el tratamiento con ENPP3xCD3 (**NPP3B815**) en presencia de células T aisladas de 6 donantes humanos sanos diferentes y añadidas en 2 diferentes relaciones E:T de 1:1 y 1:3 al ensayo con células VMRCRCW (ENPP3-media). Datos representados a las 72 y 120 horas después del tratamiento. Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; Conc., concentración; D, donante; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana; IFN, interferón; IL, interleucina; SEM, error estándar de la media; TNF, factor de necrosis tumoral.

La **Figura 26** muestra la liberación de citoquinas inducida por **NPP3B815** en presencia de células T aisladas de múltiples donantes en la línea celular cancerosa A704 de ENPP3-alta. La liberación de citoquinas se midió mediante citometría de flujo tras el tratamiento con ENPP3xCD3 (**NPP3B815**) durante 48 horas en presencia de células T (relación E:T de 3:1) aisladas de 6 donantes humanos

sanos diferentes analizados con células A704 (ENPP3-alta). Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; Conc., concentración; D, donante; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana; IFN, interferón; IL, interleucina; SEM, error estándar de la media; TNF, factor de necrosis tumoral.

La **Figura 27** muestra la destrucción de células tumorales inducida por **NPP3B815** con donantes de PBMC en diferentes relaciones E:T. Evaluación basada en Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para rojo Nuclight) medida tras el tratamiento con anticuerpos ENPP3xCD3 (**NPP3B815**) y NullxCD3 (79C3B615) en presencia de PBMC (NPP3B815: relación E:T de 5:1, 3:1 o 1:1; 79C3B615: relación E:T de 5:1) aislado de 6 donantes humanos sanos diferentes probados con la línea celular A704 (ENPP3-alta). Datos representados a las 68 horas o 72 horas después del tratamiento. Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; Conc., concentración; D, donante; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana; PBMC=células mononucleares de sangre periférica; SEM, error estándar de la media.

Las **Figuras 28A y 28B** muestran la unión de la molécula de Toom NPP3B847 a células T y células T que expresan ENPP3 de cynomolgus. (**Figura 28A**) Enlace de la herramienta ENPP3xCD3 (NPP3B847; NPP3B56 emparejado con CD3B219 con reacción cruzada de cynomolgus) y el control de isotipo (79C3B613) en la línea celular HepG2-huENPP3-KO con ENPP3-OE de cynomolgus se evaluó mediante citometría de flujo. Las barras de error son SEM. (**Figura 28B**) Se evaluó la unión de la herramienta ENPP3xCD3

(NPP3B847) en células T humanas y de cynomolgus. Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; cyno, mono cynomolgus; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Geomedia, media geométrica; SEM, error estándar de la media.

La **Figura 29** muestra la activación de células T humanas y de mono cynomolgus y la citotoxicidad mediada por células T. La destrucción de células tumorales y la activación de células T (es decir, células T $CD25^{+}$) se midieron mediante citometría de flujo tras el tratamiento con ENPP3xCD3 (**NPP3B815**), NullxCD3 emparejado (79C3B615; con brazo de CD3B2030-N106A), herramienta ENPP3xCD3 (NPP3B847; NPP3B56 emparejado con CD3B219 con reacción cruzada de cynomolgus) y anticuerpos de NullxCD3 emparejado (NPP3B41; con brazo CD3B219) durante 48 horas en presencia de células T humanas y cynomolgus (relación E:T de 3:1) analizadas con la línea celular HepG2-huENPP3-KO con ENPP3-OE de cynomolgus. Las barras de error son SEM. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; cyno, mono cynomolgus; ENPP3, miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana; SEM, error estándar de la media.

Las **Figuras 30A y 30B** muestran el efecto de **NPP3B815** sobre xenoinjertos establecidos con VMRCRCW en ratones (Estudio ONC2022-035). A los ratones NSG que portaban xenoinjertos VMRCRCW establecidos se les administró por vía IP **NPP3B815** o el anticuerpo de control NullxCD3 en las dosis indicadas. (**Figura 30A**) Los volúmenes tumorales de grupo se grafican como la media ± SEM. Las células tumorales se implantaron en el día 0 y las células T se implantaron en el día 10. El tratamiento con anticuerpos de control **NPP3B815** o NullxCD3 se realizó los días 11, 14, 18, 21, 25, 28, 31

y 34 (representados por la línea debajo del eje X). (**Figura 30B**) Gráficos de tumores individuales para los grupos tratados con anticuerpo de control CD3xNull y **NPP3B815** 1 mg/kg. * Indica una diferencia significativa de los grupos tratados con **NPP3B815** el día 39 (n=10/grupo) frente al grupo de control. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; IP, intraperitoneal; NSG, ratones gamma con inmunodeficiencia combinada severa (scid, por sus siglas en inglés) diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) o NOD.Cg Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ; SEM, error estándar de la media.

Las **Figuras 31A y 31B** muestran el efecto de NPP3B194 ([scFv] ENPP3xCD3 sin grapar) sobre xenoinjertos establecidos con HepG2 en ratones (Estudio P764Y). A los ratones NSG que portaban xenoinjertos VMRCRCW establecidos se les administró por vía IP anticuerpos de control NPP3B194 o NullxCD3 en las dosis indicadas. (**Figura 31A**) Los volúmenes tumorales de grupo se grafican como la media ± SEM. Las células tumorales se implantaron en el día 0 y las células T se implantaron en el día 21. El tratamiento con el anticuerpo de control NPP3B194 o NullxCD3 se realizó los días 22, 25, 29, 32, 36 y 39 (representado por la línea debajo del eje X). (**Figura 31B**) Gráficos de tumores individuales para grupos. * Indica una diferencia significativa de los grupos tratados con NPP3B194 el día 52 (n≥7/grupo) frente al grupo de control. Abreviaturas: CD, cúmulo de diferenciación; IP, intraperitoneal; NSG, ratones gamma con inmunodeficiencia combinada severa (scid, por sus siglas en inglés) diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) o NOD.Cg Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ; SEM, error estándar de la media.

La **Figura 32** muestra el efecto de NPP3B815 sobre el crecimiento de xenoinjertos establecidos con HepG2 en ratones humanizados con células T; * indica

una diferencia significativa de los grupos tratados con NPP3B815 en el día 45 frente al grupo de control NullxCD3. Las células tumorales se implantaron en el día 0 y las células T se implantaron en el día 21. El tratamiento con anticuerpos de control NPP3B815 o NullxCD3 se realizó los días 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43 y 46.

La **Figura 33** muestra el efecto de NPP3B815 sobre el crecimiento de xenoinjertos establecidos con RXF 488 en ratones humanizados con células T; * indica una diferencia significativa de los grupos tratados con NPP3B815 en el día 45 frente al grupo de control NullxCD3. Las células tumorales se implantaron en el día 0 y las células T se implantaron en el día 18. El tratamiento con anticuerpos de control NPP3B815 o NullxCD3 se realizó los días 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40 y 43.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los tumores sólidos han sido un desafío para la terapia de redirección de células T mediada por anticuerpos, con fármacos muy limitados, si es que hay alguno, aprobados todavía por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los EE. UU. La limitación del enfoque puede estar relacionada con la falta de especificidad del cáncer de las dianas, lo que lleva a que se produzca toxicidad en dosis subeficaces. Para mitigar esta responsabilidad, el trabajo descrito en esta descripción se ha centrado en la identificación de antígenos específicos del cáncer con un índice terapéutico potencialmente mayor basado en dianas expresadas apicalmente. Las dianas de las proteínas apicales son inalcanzables para los anticuerpos dirigidos a través del torrente sanguíneo en los tejidos normales; sin embargo, en los tumores caracterizados por una expresión desorganizada, estas proteínas son alcanzables a través del torrente sanguíneo. Usando este enfoque, se identificó ENPP3 como una diana con expresión principalmente apical en tejidos normales y expresión despolarizada en cáncer.

La invención proporciona agente de unión a ENPP3 monoespecíficos y biespecíficos y métodos de uso de estos. En una modalidad, se proporcionan composiciones que comprenden los agentes de unión a ENPP3 (monoespecífico o biespecífico). Las composiciones descritas pueden usarse para realizar los métodos para usar los fragmentos de unión a ENPP3 proporcionados en la presente, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, las composiciones descritas pueden incluir agentes biespecíficos para el uso en la detección de la presencia de antígenos diana múltiples (p. ej., ENPP3 y CD3) en una muestra biológica. Por

consiguiente, las composiciones descritas pueden incluir uno o más de los agentes de unión (p. ej., anticuerpos o proteínas), o una región de unión al antígeno de estos, descritos en la presente. En una modalidad, se proporciona un agente de unión biespecífico que comprende una primera región de unión que se une específicamente a ENPP3 y una segunda región de unión que se une específicamente a CD3ε.

En algunas modalidades, la invención proporciona el uso de las composiciones o agentes de unión biespecíficos de la invención para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o trastorno. En una modalidad, la enfermedad o trastorno es cáncer.

En algunas modalidades, la invención proporciona el uso de las composiciones o agente de unión biespecíficos de la invención para dirigir células T a una célula que expresa ENPP3. En una modalidad, la célula que expresa ENPP3 es una célula cancerosa.

5.1 Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en la presente incluyen aquellos que son generalmente muy entendidos y/o usados comúnmente mediante una metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente usadas y que se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3d ed. 2001); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* eds., 2003); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed. 2009); Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Ed. Albitar. 2010); and Antibody Engineering Vols 1 and 2 (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010).

5.2 Terminología

A menos que se describa de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la técnica. Con fines de interpretar esta especificación, se aplicará la siguiente descripción de términos, y siempre que sea apropiado, los términos usados en singular también incluyen el plural y viceversa. Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes publicadas y otras publicaciones se incorporan en su totalidad como referencia. En el caso de que cualquier descripción de los términos establecidos entre en conflicto con algún documento incorporado como referencia en la presente, prevalecerá la descripción del término que se expone a continuación.

A menos que se definan de cualquier otra manera, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado tal como comúnmente lo entiende el experto en la técnica. Siempre que sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier descripción de un término establecido entre en conflicto con algún documento incorporado como referencia en la presente, prevalecerá la descripción del término que se expone a continuación.

El término "agente de unión" como se usa en la presente se refiere a una molécula que se une a un antígeno o diana específico (p. ej., ENPP3 y/o CD3). Un agente de unión puede comprender una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, o un compuesto de peso molecular pequeño. En algunas modalidades, un agente de unión comprende un anticuerpo de longitud completa. En algunas modalidades, el agente de unión es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. En algunas modalidades, un

agente de unión comprende un supercóntigo de proteína o supercóntigo artificial (p. ej., una cadena principal de no inmunoglobulina). En algunas modalidades, un agente de unión es una proteína de fusión que comprende un sitio de unión al antígeno. En algunas modalidades, un agente de unión es una molécula biespecífica que comprende al menos dos sitios de unión al antígeno. En algunas modalidades, un agente de unión es una molécula multiespecífica que comprende al menos tres sitios de unión al antígeno.

Los términos ‘‘ENPP3’’ ‘‘proteína ENPP3’’ y ‘‘polipéptido ENPP3’’ abarcan un polipéptido (‘‘polipéptido’’ y ‘‘proteína’’ se usan indistintamente en la presente), que incluyen cualquier polipéptido nativo, de cualquier fuente de vertebrados, incluidos mamíferos tales como primates (p. ej., humanos y monos cynomolgus (cynomolgus)), perros y roedores (p. ej., ratones y ratas), a menos que se indique de cualquier otra manera. En ciertas modalidades, los términos incluyen ‘‘polipéptidos de ENPP3 relacionados’’, que incluyen variantes de SNP de estos. El término ‘‘ENPP3’’ también abarca ‘‘longitud completa’’, ENPP3 no procesada así como cualquier forma que resulte del procesamiento.

El término ‘‘cúmulo de diferenciación 3 ε’’ o ‘‘CD3ε’’ se refiere a una proteína conocida que también se denomina ‘‘cadena épsilon CD3 de glicoproteína de superficie de células T’’, o ‘‘T3E’’. El CD3ε, junto con el CD3 gamma, delta y zeta, y los receptores de célula T alfa/beta y heterodímeros gamma/delta, forma el complejo CD3 receptor de células T. Este complejo desempeña un papel importante en el acoplamiento del reconocimiento de antígenos a varias vías de transducción de señales intracelulares. El complejo CD3 media la transducción de señales, lo que da como resultado la activación y proliferación de células T. El CD3 es necesario para la respuesta inmune. La

secuencia de aminoácidos de una CD3ε de longitud completa se muestra en la sec. con núm. de ident.: 293. La secuencia de aminoácido del dominio extracelular (ECD) de CD3ε se muestra en la sec. con núm. de ident.: 294. A lo largo de la memoria descriptiva, ‘‘CD3ε-específico’’ o ‘‘se une específicamente a CD3ε’’ o ‘‘anticuerpo anti-CD3ε’’ se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido CD3ε (sec. con núm. de ident.: 293), que incluye los anticuerpos que se unen específicamente al dominio extracelular de CD3ε (ECD) (sec. con núm. de ident.: 294);

CD3 épsilon humano:

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT CPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYP RGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKN RKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR RI (sec. con núm. de ident.: 293)

dominio extracelular de CD3 épsilon humano:

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDED DKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCM EMD (sec. con núm. de ident.: 294)

Los términos "se une" o "unión" se refieren a una interacción entre moléculas que incluyen, por ejemplo, formar un complejo. Las interacciones pueden ser, por ejemplo, interacciones no covalentes que incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas y/o interacciones de Van der Waals. Un complejo puede también incluir la unión de dos o más moléculas que se mantienen unidas mediante enlaces covalentes o no covalentes, interacciones o fuerzas. La resistencia de las

interacciones no covalentes totales entre un sitio de unión al antígeno único en un anticuerpo y un epítopo único de una molécula diana, tal como un antígeno, es la afinidad del anticuerpo o del fragmento funcional para ese epítopo. La relación del índice de disociación ($k_{inactiva}$) al índice de asociación (k_{activa}) de una molécula de unión (p. ej., un anticuerpo) con un antígeno monovalente ($k_{inactiva}/k_{activa}$) es la constante de disociación K_D, que está inversamente relacionada con la afinidad. Cuanto menor es el valor de K_D, mayor es la afinidad del anticuerpo. El valor de K_D varía para diferentes complejos de anticuerpo y antígeno y depende del k_{activa} y $k_{inactiva}$. La constante de disociación K_D para un anticuerpo proporcionado en la presente puede determinarse mediante cualquier método proporcionado en la presente o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. La afinidad en un sitio de unión no siempre refleja la verdadera fuerza de la interacción entre un anticuerpo y un antígeno. Cuando los antígenos complejos que contienen múltiples determinantes antigénicos repetitivos, tales como un antígeno polivalente, entran en contacto con anticuerpos que contienen múltiples sitios de unión, la interacción del anticuerpo con el antígeno en un sitio aumentará la probabilidad de una reacción en un segundo sitio. La fuerza de tales interacciones múltiples entre un anticuerpo multivalente y el antígeno se denomina avidez.

En relación con las moléculas de unión descritas en la presente, términos tales como “unirse a”, “que se une específicamente a” y términos análogos se usan, además, indistintamente en la presente y se refieren a moléculas de unión de dominios de unión al antígeno que se unen específicamente a un antígeno, tal como un polipéptido. Una molécula de unión o dominio de unión al antígeno que se une a, o se une específicamente a, un antígeno puede identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, Octet®,

Biacore®, u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, una molécula de unión o dominio de unión al antígeno se une a o se une específicamente a un antígeno cuando se une a un antígeno con mayor afinidad que a cualquier antígeno de reacción cruzada como se determina usando técnicas experimentales, tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y puede ser más de 10 veces de fondo. Ver, *p. ej.*, Fundamental Immunology 332-36 (Paul ed., segunda edición, 1989) para un debate con respecto a la especificidad de unión. En ciertas modalidades, el grado de unión de una molécula de unión o dominio de unión al antígeno a una proteína "no objetivo" es menor que aproximadamente el 10 % de la unión de la molécula de unión o dominio de unión al antígeno a su antígeno objetivo particular, por ejemplo, como se determina mediante el análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Una molécula de unión o dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno incluye uno que es capaz de unirse al antígeno con afinidad suficiente de manera que la molécula de unión sea útil, por ejemplo, como un agente terapéutico y/o diagnóstico para dirigir el antígeno. En ciertas modalidades, una molécula de unión o dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno tiene una constante de disociación (K_D) menor que o igual a 1μM, 800 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 300 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM o 0,1 nM. En ciertas modalidades, una molécula de unión o dominio de unión al antígeno se une a un epítopo de un antígeno conservado entre el antígeno de diferentes especies.

El término “anticuerpo”, “inmunoglobulina”, o “Ig” se usa indistintamente en la presente y se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (que incluyen agonista, antagonista, anticuerpos neutralizantes, anticuerpos monoclonales de longitud completa), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica o monoepitópica, anticuerpos producidos recombinantemente, anticuerpos de dominio único (p. ej., VHH), anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o versiones humanas de anticuerpos que tienen cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa. Los anticuerpos también incluyen fragmentos de anticuerpos (y/o polipéptidos que comprenden fragmentos de anticuerpos) que retienen las características de unión de sus anticuerpos parentales. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen regiones de unión al antígeno y/o regiones efectoras del anticuerpo, p. ej., Fab, Fab’, $F(ab')_2$, Fv, scFv, $(scFv)_2$, molécula de anticuerpo monocatenario, anticuerpo de dominio variable dual, dominio variable único, anticuerpo lineal, región V, un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpos, $F(ab)_2$, Fd, Fc, diacuerpo, didiacuerpo, Fv ligados a disulfuro (dsFv), anticuerpo de dominio único (p. ej., nanocuerpo) u otros fragmentos (p. ej., fragmentos que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera que están acopladas de manera no covalente). En términos generales, un dominio de región variable (V) puede ser cualquier arreglo adecuado de dominios variables pesados de inmunoglobulina (VH) y/o ligeros (VL) de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos también incluyen anticuerpos tetraméricos que comprenden dos moléculas

de cadena pesada y dos moléculas de cadenas ligera, un monómero de cadena ligera de anticuerpo, y un monómero de cadena pesada de anticuerpo. Por lo tanto, por ejemplo, el dominio de la región V puede ser dimérico y contener dímeros VHH-VHH, VH-VH, VH-VL, o VL-VL que se unen a ENPP2. Si se desea, la VH y VL se pueden acoplar covalentemente directamente o a través de un enlazador para formar un Fv monocatenario (scFv). Para facilitar la referencia, las proteínas scFv se denominan en la presente tal como se incluyen en la categoría "fragmentos de anticuerpos" Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo. Las CDR (también denominadas "unidades de reconocimiento mínimo" o "regiones hipervariables") se pueden obtener mediante la construcción de polinucleótidos que codifican una o más CDR de interés. Tales polinucleótidos se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable usando ARNm de células productoras de anticuerpos como plantilla (ver, por ejemplo, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press (1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al., (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)). Los fragmentos de anticuerpos se pueden incorporar, por ejemplo, en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, dominios variables de nuevos receptores de antígenos (v-NAR), y regiones Fv bicatenarios (ver, p. ej.,

Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136, 2005). En algunas modalidades, los anticuerpos que comprenden una VH y/o VL contienen una región constante de cadena ligera y/o una de cadena pesada, tal como una o más regiones constantes, que incluyen una o más regiones constantes de la IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden incluir fragmentos de unión al epítopo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o cualquier subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de la molécula de inmunoglobulina.

Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión al antígeno así como un CL y al menos regiones constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las regiones constantes pueden incluir regiones constantes humanas o variantes de secuencia de aminoácidos de estas. En ciertas modalidades, un anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras. Un ‘‘fragmento funcional’’, ‘‘fragmento de unión’’, o ‘‘fragmento de unión al antígeno’’ de un anticuerpo terapéutico exhibirán al menos una o todas las funciones biológicas atribuidas al anticuerpo intacto, la función comprende al menos la unión al antígeno diana (p. ej., un fragmento de unión a ENPP3 o fragmento que se une a ENPP3).

Una unidad de anticuerpo de 4 cadenas típica es una glicoproteína heterotetramétrica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 dáltones. Cada cadena L se une a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L

también tienen puentes de disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (VH) seguido por tres dominios constantes (CH) para cada una de las cadenas α e γ y cuatro dominios CH para isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (VL) seguido por un dominio constante (CL) en su otro extremo. El VL está alineado con el VH, y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un VH y VL juntos forma un sitio de unión al antígeno único. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology 71 (Stites, *et al.* eds., octava edición, 1994); e Immunobiology (Janeway *et al.* Editores, 5.ª ed. 2001).

El término "región variable", "dominio variable", "región V" o "dominio V" se refiere a una porción de las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo que, generalmente, se ubica en el extremo amino-terminal de la cadena ligera o pesada y tiene una longitud de aproximadamente 120 a 130 aminoácidos en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, y se usa en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La región variable de cadena pesada puede mencionarse como "VH". La región variable de cadena ligera puede mencionarse como "VL". El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de las regiones variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos. La región V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través del tramo de 110 aminoácidos de las regiones

variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos menos variables (p. ej., relativamente invariantes) llamados regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de mayor variabilidad (p. ej., variabilidad extrema) llamadas "regiones hipervariables", que tienen cada una aproximadamente 9-12 aminoácidos de longitud. Las regiones variables de cadenas pesada y ligera comprenden cada una cuatro FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (*ver, p. ej.,* Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (quinta edición, 1991)). Las regiones constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las regiones variables difieren extensamente en secuencias entre diferentes anticuerpos. En modalidades específicas, la región variable es una región variable humana.

El término ‘‘numeración de residuos de región variable de acuerdo con Kabat" o ‘‘numeración de posición de aminoácidos como en Kabat’’, y variaciones de estos, se refiere al sistema de numeración usado para regiones variables de cadena pesada o regiones variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Con el uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real

puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 y tres residuos insertados (p. ej., residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar". El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (*p. ej.,* Kabat *et al.*, *supra*). El “sistema de numeración de la EU” o “índice de la EU” se usa generalmente para referirse a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (*p. ej.*, el índice de la EU indicado en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice de la UE como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG 1 de la UE. Otros sistemas de numeración han sido descritos, por ejemplo, por AbM, Chothia, Contact, IMGT y AHon.

El término "cadena pesada", cuando se usa con referencia a un anticuerpo, se refiere a una cadena polipeptídica de aproximadamente 50-70 kDa, en donde la porción amino-terminal incluye una región variable de aproximadamente 120 a 130 o más aminoácidos, y una porción carboxi-terminal incluye una región constante. La región constante puede ser aquella de cinco tipos distintos (p. ej., isotipos) denominados alfa (α), delta (δ), épsilon (ε), gamma (γ), y mu (μ), basada en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño: α, δ e γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ε

contienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cuando se combinan con una cadena ligera, estos distintos tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases bien conocidas (p. ej., isotipos) de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, que incluyen cuatro subclases de IgG, específicamente IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El término "cadena ligera", cuando se usa con referencia a un anticuerpo, se refiere a una cadena de polipéptidos de aproximadamente 25 kDa, en donde la porción amino-terminal incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente 110 o más aminoácidos, y una porción carboxi-terminal incluye una región constante. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Existen dos tipos distintos, denominados kappa (κ) o lambda (λ) basados en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes.

Como se usa en la presente, los términos "región hipervariable", "HVR", “región determinante de complementariedad” y "CDR" se usan indistintamente. Una "CDR" se refiere a una de tres regiones hipervariables (H1, H2 o H3) dentro de la región no estructural de la estructura de hoja-β de VH de la inmunoglobulina (Ig o anticuerpo) o una de tres regiones hipervariables (L1, L2 o L3) dentro de la región no estructural de la estructura de hoja-β de VL del anticuerpo. CDR1, CDR2 y CDR3 en el dominio VH también se denominan HCDR1, HCDR2 y HCDR3, respectivamente. CDR1, CDR2 y CDR3 en el dominio V también se denominan LCDR1, lCDR2 y LCDR3, respectivamente. En consecuencia, las CDR son secuencias de región variable intercaladas dentro de las secuencias de región estructural.

Las regiones CDR son bien conocidas por los expertos en la técnica y han sido definidas por sistemas de numeración muy conocidos. Por ejemplo, las regiones

determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de la secuencia y son las más comúnmente usadas (ver, p. ej., Kabat *et al.*, *supra*); Jia et al., J Immunol 2010; 184:5696-5704). Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (ver, *p. ej.,* Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)). El extremo del bucle de CDR-H1 de Chothia, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si 35A y 35B están presentes, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos de AbM de Oxford Molecular (*ver, p. ej.,* Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann y Dübel eds., segunda ed. 2010)). Las regiones hipervariables de "contacto" están basadas en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Otro sistema de numeración universal desarrollado y adoptado ampliamente es ImMunoGeneTics (IMGT) Information System® (Lafranc *et al.*, *Dev.* Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003)). IMGT es un sistema integrado de información especializado en inmunoglobulinas (IG), receptores de células T (TR) y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de humanos y otros vertebrados. En la presente, se hace referencia a las CDR en términos de secuencia de aminoácidos y la ubicación dentro de la cadena ligera o pesada. Debido a que la "ubicación" de las CDR dentro de la estructura del dominio variable de la inmunoglobulina se conserva entre las especies y se encuentra presente en

estructuras denominadas bucles, usando sistemas de numeración que alinean secuencias de dominio variable de acuerdo con características estructurales, los residuos de marco y CDR y se identifican fácilmente. Esta información puede usarse en el injerto y reemplazo de residuos de CDR de inmunoglobulinas de una especie en una estructura aceptora, típicamente, de un anticuerpo humano. Un sistema de numeración adicional (AHon) ha sido desarrollado por Honegger y Plückthun, J. Mol. Biol. 309: 657-70 (2001). La correspondencia entre el sistema de numeración, que incluye, por ejemplo, la numeración de Kabat y el sistema de numeración único de IMGT, es muy conocida por un experto en la técnica (*ver, p. ej.,* Kabat, *supra*; Chothia y Lesk, *supra*; Martin, *supra*; Lefranc *et al.*, *supra*). Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables o CDR se ejemplifican en la tabla a continuación.

CDR ilustrativas de acuerdo con diversos sistemas de numeración

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 o L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 o L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 o L89--L97	L89--L96	L105-L117
CDR H1	H31--H35B (Numeración de Kabat)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Numeración de Chothia)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 o H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 o H95--H102	H93--H101	H105-H117

Los límites de una CDR dada pueden variar dependiendo del esquema usado para la identificación. En consecuencia, a menos que se especifique de

cualquier otra manera, los términos "CDR" y "región determinante complementaria" de un anticuerpo determinado o región de este, tal como una región variable, así como las CDR individuales (*p. ej.,* CDR-H1, CDR-H2) del anticuerpo o región de este, debe entenderse que abarcan la región determinante complementaria como se define por cualquiera de los esquemas conocidos descritos anteriormente en la presente. En algunos casos, se especifica el esquema para identificar una CDR o CDR particulares, tal como la CDR definida por el método IMGT, Kabat, Chothia, o de Contact. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR. Cabe señalar que las regiones CDR pueden definirse además por una combinación de diversos sistemas de numeración, *p. ej.,* una combinación de sistemas de numeración de Kabat y Chothia, o una combinación de sistemas de numeración de Kabat e IMGT. Por lo tanto, el término tal como “una CDR como se expone en una VH específica” incluye cualquier CDR1 como se define por los sistemas de numeración de CDR ilustrativos descritos anteriormente, pero no se limita a estos. Una vez que se proporciona una región variable (*p. ej.,* una VH o VL), los expertos en la técnica entenderán que las CDR dentro de la región pueden definirse por diferentes sistemas de numeración o combinaciones de estos.

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL, y 26-35 o 26-35A (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH.

El término "marco" o "FR" se refiere a los residuos de la región variable que flanquean las CDR. Los residuos de FR están presentes, por ejemplo, en anticuerpos

quiméricos, humanizados, humanos, de dominio, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos biespecíficos. Los residuos de FR son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable o residuos de CDR.

El término "región constante" o "dominio constante" se refiere a una porción del extremo carboxi terminal de la cadena ligera y pesada que no está implicada directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero que exhibe diversas funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor Fc. Los términos se refieren a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, la región variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. La región constante puede contener las regiones CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y la región CL de la cadena ligera.

El término "región Fc", en la presente, se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye, por ejemplo, regiones Fc de secuencia nativa, regiones Fc recombinantes y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana se define, frecuentemente, como tramo desde un residuo de aminoácidos en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo-terminal de esta. La lisina de extremo C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447

eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Un "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una secuencia nativa de la región Fc. Las "funciones efectoras" ilustrativas incluyen la unión a C1q; CDC; unión de receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación en descenso de los receptores de superficie celular (*p. ej.,* receptor de células B), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con una región de unión o dominio de unión (*p. ej.,* una región o dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando varios ensayos conocidos por los expertos en la técnica. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos (p. ej., mediante sustitución, adición o deleción). En ciertas modalidades, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, o de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa en la región Fc de un polipéptido parental. En la presente descripción, la región Fc variante puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, o al menos aproximadamente 90 % de homología con esta, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 % de homología con esta.

La expresión ‘‘dominio de unión al antígeno’’ o ‘‘región de unión al antígeno’’ se refiere a un agente de unión o una porción de un agente de unión como se describe en la presente (tal como una proteína o un anticuerpo o fragmento de este) que se une a

un antígeno. En algunas modalidades, una región de unión al antígeno puede comprender uno o más fragmentos o porciones de un anticuerpo intacto como se describe en la presente. La expresión “dominio de unión al antígeno” o “región de unión al antígeno” puede ser un fragmento de anticuerpo como se describió anteriormente.

El término "Fab" o "región Fab" se refiere a una región de anticuerpo que se une al antígeno. Una IgG convencional comprende, usualmente, dos regiones Fab, cada una de las cuales reside en uno de los dos brazos de la estructura de IgG en forma de Y. Cada región Fab se compone, típicamente, de una región variable y una región constante de cada una de las cadenas pesada y ligera. Más específicamente, la región variable y la región constante de la cadena pesada en una región Fab son regiones VH y CH1, y la región variable y la región constante de la cadena ligera en una región Fab son regiones VL y CL. Las VH, CH1, VL y CL en una región Fab pueden disponerse de varias maneras para conferir una capacidad de unión al antígeno de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, las regiones VH y CH1 puede estar en un polipéptido, y las regiones VL y CL pueden estar en un polipéptido separado, de manera similar a una región Fab de una IgG convencional. Alternativamente, las regiones VH, CH1, VL y CL pueden estar en el mismo polipéptido y orientadas en diferentes órdenes, como se describe en mayor detalle en las secciones a continuación.

El término “Fv monocatenario” o “scFv” se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera (VL) y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH), en donde VL y VH están unidas contiguamente a través de un enlazador de polipéptido, y pueden expresarse como

un polipéptido de cadena única. A no ser que se especifique, como se usa en la presente, scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, p. ej., con respecto al extremo N y el extremo C del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

El término “(scFv)2” o “scFv en tándem” o “bis-scFv” se refiere a una proteína de fusión que comprende dos regiones variables de cadena ligera (VL) y dos regiones variables de cadena pesada (VH), en donde las dos VL y las dos VH están unidas contiguamente a través de enlazadores de polipéptidos, y pueden expresarse como un polipéptido de cadena única. Las dos VL y dos VH se fusionan por enlaces peptídicos para formar una molécula bivalente VL_A-enlazador-VH_A-enlazador-VL_B-enlazador-VH_B para formar dos sitios de unión, capaces de unir dos antígenos o epítopos diferentes al mismo tiempo.

“Fv de cadena única engrapado” o “spFv” se refieren a un scFv que comprende uno o más enlaces disulfuro entre la VH y el enlazador o la VL y el enlazador. Típicamente, el spFv puede comprender un enlace disulfuro entre la VH y el enlazador, un enlace disulfuro entre la VL y el enlazador o dos enlaces disulfuro entre la VH y el enlazador y la VL y el enlazador. Las moléculas de scFv que comprenden enlaces disulfuro entre la VH y la VL están excluidas del término "spFv".

“Punto de anclaje” se refiere a un residuo de cisteína (Cys) del marco de la VH o de la VL de un scFv que puede mutagenizarse a Cys sin un efecto desfavorable para la estructura total del scFv y que es capaz de formar un enlace disulfuro con un Cys que reside en el enlazador de scFv.

“Grapa” se refiere al enlazador de scFv que contiene uno o dos residuos Cys que son capaces de formar un enlace disulfuro con el punto de anclaje de Cys.

El término “multiespecífico” se refiere a una molécula, tal como un anticuerpo que se une específicamente a dos o más antígenos distintos o a dos o más epítopos distintos dentro del mismo antígeno. La molécula multiespecífica puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogos), tales como un ser humano o un mono, por ejemplo, *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno) o *Pan troglodytes*, o puede unirse a un epítopo que se comparte entre dos o más antígenos distintos.

El término “biespecífico” se refiere a una molécula (tal como una proteína o un anticuerpo) que se une específicamente a dos antígenos distintos o dos epítopos distintos dentro del mismo antígeno. El anticuerpo biespecífico puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogos), tales como un ser humano o un mono, por ejemplo, *Macaca cynomolgus* (cynomolgus, cyno), *Pan troglodytes*, o puede unirse a un epítopo que se comparte entre dos o más antígenos distintos.

Los términos "anticuerpo biespecífico anti-ENPP3/anti-CD3", "anticuerpo ENPP3/CD3", "anticuerpo ENPP3xCD3", "proteína anti-ENPP3/anti-CD3" y lo similar se refieren a un anticuerpo que se une a ENPP3 y CD3, es decir, que comprende al menos un dominio de unión que se une específicamente a ENPP3 y al menos un dominio de unión que se une específicamente a CD3. Los dominios que se unen específicamente a ENPP3 y CD3 son, típicamente, pares V_H/V_L. El anticuerpo biespecífico anti-ENPP3×CD3 puede ser monovalente en términos de su unión a ENPP3 o CD3.

El término ‘‘anticuerpo monoclonal’’, como se usa en la presente, se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogénea involucrada en el reconocimiento altamente específico y la unión de un único determinante antigénico o epítopo. El término ‘‘anticuerpo monoclonal’’ abarca anticuerpos intactos y de longitud completa así como fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, Fab′, $F(ab')_2$, Fv), anticuerpos monocatenarios, scFv, proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende al menos un sitio de unión al antígeno. Además, ‘‘anticuerpo monoclonal’’ se refiere a tales anticuerpos elaborados mediante cualquier número de técnicas, que incluyen, entre otros, producción de hibridoma, presentación de genotecas de fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos.

Los términos ‘‘epítopo’’ y ‘‘determinante antigénico’’ se usan indistintamente en la presente y se refieren a esa porción de un antígeno o diana capaz de ser reconocida y unida por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno o diana es un polipéptido, se pueden formar epítopos tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de la proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos (también denominados epítopos lineales) se retienen típicamente tras la desnaturalización de proteínas, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario (también denominados epítopos conformacionales) se pierden típicamente tras la desnaturalización de proteínas. Un epítopo suele incluir al menos 3, y más frecuentemente, al menos 5, 6, 7, u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los epítopos se pueden predecir usando uno cualquiera de un gran número de herramientas de software bioinformáticas disponibles al público. La cristalografía de rayos

X se puede usar para caracterizar un epítopo en una proteína diana mediante el análisis de las interacciones de residuos de aminoácidos de un complejo antígeno/anticuerpo.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de cadena pesada y/o ligera se deriva de una primera fuente o especie, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

El término "anticuerpo humanizado", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera humanas, en donde los residuos de aminoácidos de CDR nativos se reemplazan por residuos de CDR correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej., ratón, rata, conejo, o primate no humano), en donde el anticuerpo no humano tiene la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas. En algunas modalidades, uno o más residuos de aminoácidos de la región marco de las regiones variables de cadena pesada o cadena ligera humana se reemplazan por residuos correspondientes del anticuerpo no humano. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo humano o en el anticuerpo no humano. En algunas modalidades, estas modificaciones se realizan para refinar y/u optimizar adicionalmente las características del anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina humana (p. ej., CH1, CH2, CH3, Fc, y/o región bisagra).

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un humano y/o un anticuerpo que se ha elaborado usando cualquiera de las técnicas conocidas por las personas del oficio de nivel medio para preparar

anticuerpos humanos. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, genotecas de exhibición de fagos, genotecas de exhibición de levadura, animales transgénicos, producción de proteína recombinante y tecnología de hibridoma de células B.

Los términos "polipéptido" y “péptido” y "proteína" pueden usarse indistintamente en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se modificó naturalmente o por intervención; por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación. Dentro de la definición también se incluyen, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido, que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta descripción pueden estar basados en anticuerpos, el término “polipéptido” abarca polipéptidos como una única cadena y polipéptidos de dos o más cadenas asociadas.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” se usan indistintamente en la presente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante la polimerasa de ADN o ARN.

Los términos “idénticos” o “identidad” porcentual, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que

son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo separaciones si es necesario) para una máxima correspondencia, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse usando un software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Diversos algoritmos y softwares que pueden usarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se conocen bien en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, y variantes de estos. En algunas modalidades, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la descripción son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % y, en algunas modalidades, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima, como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En algunas modalidades, la identidad existe en una región de las secuencias que tienen una longitud de al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 20-40, al menos aproximadamente 40-60, al menos aproximadamente 60-80 nucleótidos o aminoácidos, o cualquier valor integral intermedio. En algunas modalidades, la identidad existe en una región de longitud mayor que 60-80 nucleótidos o aminoácidos, como al menos aproximadamente 80-100 nucleótidos o aminoácidos, y en algunas modalidades las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, por ejemplo, (i) la región codificante de una secuencia de nucleótidos o (ii) una secuencia de aminoácidos.

El término ‘‘vector’’, como se usa en la presente, significa una construcción que es capaz de administrar, y usualmente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ARN o ARN desnudo, plásmido, cósmido, o vectores de fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.

El término ‘‘aislado’’, como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido, proteína soluble, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Un anticuerpo ‘‘aislado’’ está sustancialmente libre de material de la fuente celular a partir de la cual se deriva. En algunas modalidades, los polipéptidos aislados, proteínas solubles, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones son aquellos que se han purificado hasta un grado en el que ya no tienen una forma que se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido, proteína soluble, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se aísla es sustancialmente puro. Un polipéptido, proteína soluble, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición puede aislarse de una fuente natural (p. ej., tejido) o de una fuente tal como una línea celular diseñada por ingeniería genética.

Como se usa en la presente, el término ‘‘sustancialmente puro’’ se refiere a un material que es al menos 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), al menos 90 % puro, al menos 95 % puro, al menos 98 % puro, o al menos 99 % puro.

El término ‘‘sujeto’’ se refiere a cualquier animal (*p. ej.*, un mamífero), que incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, conejos, roedores, y lo similar.

El término ‘‘composición farmacéutica’’ o ‘‘formulación farmacéutica’’, como se usa en la presente, se refiere a una preparación que está en tal forma como para permitir que la actividad biológica del agente de unión sea efectiva. Una formulación o composición farmacéutica comprende generalmente componentes adicionales, tales como un excipiente, portador, adyuvante, reguladores farmacéuticamente aceptables, etc.

El término ‘‘cantidad efectiva’’ o ‘‘cantidad terapéuticamente efectiva’’, como se usa en la presente, se refiere a la cantidad de un agente que es suficiente para reducir y/o mejorar la gravedad y/o duración de (i) una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto, y/o (ii) un síntoma en un sujeto. El término también abarca una cantidad de un agente necesario para la (i) reducción o mejora del avance o progresión de una enfermedad, trastorno o afección determinada, (ii) reducción o mejora de la recurrencia, desarrollo o inicio de una enfermedad, trastorno o afección determinada, y/o (iii) la mejora o potenciación de los efectos profilácticos o terapéuticos de otro agente o terapia (p. ej., un agente distinto de los agentes de unión proporcionados en la presente).

El término ‘‘tratar’’ o ‘‘tratamiento’’ o ‘‘que trata’’ o ‘‘para tratar’’ o ‘‘aliviar’’ o alivio’’ o ‘‘que alivia’’ o ‘‘para aliviar’’ como se usa en la presente se refiere a medidas terapéuticas que tienen como objetivo curar, ralentizar, disminuir los síntomas de, y/o detener la progresión de una afección o trastorno patológico. Por lo tanto, los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno.

El término ‘‘respuesta inmune’’, como se usa en la presente, incluye respuestas tanto del sistema inmune innato como del sistema inmune adaptativo. Incluye respuestas inmunitarias mediadas tanto por células y/o humorales. Incluye respuestas de células T y células B, así como respuestas de otras células del sistema

inmunitario, tales como células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), monocitos, macrófagos, células dendríticas, etc.

Como se usa en la presente, la referencia a "alrededor de" o "aproximadamente" un valor o parámetro incluye (y describe) modalidades que se dirigen a ese valor o parámetro. Por ejemplo, una descripción que se refiere a “aproximadamente X” incluye la descripción de “X”.

Como se usa en la presente y reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen las formas plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera.

Se entiende que donde se describen modalidades en la presente con el término "que comprende", también se proporcionan de cualquier otra manera modalidades análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en". También se entiende que donde se describen modalidades en la presente con el uso de la frase "que consiste esencialmente en", también se proporcionan de cualquier otra manera modalidades análogas descritas en términos de "que consiste en".

El término "y/o", como se usa en una frase tal como "A y/o B" en la presente, pretende incluir ambos A y B; A o B; A (solo); y B (solo). De la misma manera, el término "y/o", como se usa en una frase tal como "A, B y/o C", pretende abarcar cada una de las siguientes modalidades: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

5.3 Agentes de unión a ENPP3

En un aspecto, en la presente se proporciona un agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une a ENPP3 (*p. ej.,* ENPP3

humana). En algunas modalidades, el presente agente de unión comprende al menos una porción que es un polipéptido. En algunas modalidades, el presente agente de unión comprende al menos una porción que no es un polipéptido. En algunas modalidades, los presentes agentes de unión son proteínas de unión a ENPP3.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona agentes de unión (p. ej., anticuerpos o proteínas) que se unen a ENPP3. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 se une a una proteína ENPP3 o un fragmento de esta proveniente de un mamífero. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 se une a una proteína ENPP3 humana o un fragmento de esta. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 se une a una proteína ENPP3 o un fragmento de este originado a partir de especies de mamíferos no humanos. En algunas modalidades, la especie de mamífero no humano es un roedor (p. ej., ratones y ratas). En algunas modalidades, la especie de mamífero no humano es un perro. En algunas modalidades, la especie de mamífero no humano es un mono cynomolgus (cynomolgus).

En algunas modalidades, el agente de unión comprende una región de unión al antígeno que se une a ENPP3. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 en la presente proteína de unión es un anticuerpo o un dominio de unión derivado de un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En

algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG3. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada de la IgG. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG2. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG4. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera kappa. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera lambda. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera lambda. En algunas modalidades, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo es un scFv. En algunas modalidades, el anticuerpo es un scFv enlazado a disulfuro. En algunas modalidades, el anticuerpo es un spFv. En algunas modalidades, el anticuerpo es un $sc(Fv)_2$ enlazado a disulfuro. En algunas modalidades, el anticuerpo es un Fab, Fab', o un anticuerpo $F(ab)_2$. En algunas modalidades, el anticuerpo es un diacuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un nanocuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo triespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo multivalente. En algunas modalidades, el anticuerpo es

un anticuerpo bivalente. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo trivalente. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo tetravalente.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une a ENPP3 (*p. ej*., ENPP3 humana) con una constante de disociación (K_D) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM, o ≤ 0,001 nM (*p. ej.* 10^{-8} M o menos, *p. ej.* de 10^{-8} M a 10^{-13} M, *p. ej.*, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une a ENPP3 con una constante de disociación de ≤ 0,1 nM. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une a ENPP3 con una constante de disociación de ≤ 0,2 nM. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une a ENPP3 con una constante de disociación de ≤ 0,3 nM. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une a ENPP3 con una constante de disociación de ≤ 0,8 nM. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une a ENPP3 con una constante de disociación de ≤ 3 nM. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une a ENPP3 con una constante de disociación de ≤ 9 nM. En la técnica se conocen una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede usar para los fines de la presente descripción, incluyendo mediante RIA, por ejemplo, realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno (Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293: 865-81); mediante ensayos de interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés) o de resonancia de plasmones de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) por Octet®, usando, por ejemplo, un sistema Octet®Red96, o por Biacore®, usando, por ejemplo, un Biacore®TM-2000 o un Biacore®TM-3000. Una "tasa activa" o

"tasa de asociación" o "kactiva" también se puede determinar con las mismas técnicas de interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés) o de resonancia de plasmones de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) descritas anteriormente usando, por ejemplo, el sistema Octet®Red96, el Biacore®TM-3000 o el Biacore®TM-8000.

En un aspecto, en la presente se proporciona un agente de unión que se une a ENPP3. En una modalidad, el agente de unión comprende una región de unión a ENPP3. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 es cualquiera de aquellas en las **Tablas 1-11**.

En algunas modalidades, la región de unión de ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más secuencias de CDR de VH o VL que tienen la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las **Tablas 1-11** .

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22. En otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23. En aun otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una

LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:1, 7, 9, 11 o 17; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:2, 8, 10, 12, y 18, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:3, 13 o 19; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:4, 14 o 20; (v) una

LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:5, 15 o 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:6 o 16. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 1**.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:1, 7, 9, 11, y 17; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:2, 8, 10, 12, y 18, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:3, 13, y 19; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:4, 14, y 20; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:5, 15, y 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:6 y 16.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.:2, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:7, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:8, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:14, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:17, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:1, 2, y 3, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:4, 5, y 6, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:1, 2, y 3, respectivamente,

y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:4, 5, y 6, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:7, 8, y 3, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:4, 5, y 6, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:7, 8, y 3, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:4, 5, y 6, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:9, 10, y 3, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:4, 5, y 6, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de

aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:9, 10, y 3, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:4, 5, y 6, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:11, 12, y 13, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:14, 15, y 16, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:11, 12, y 13, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:14, 15, y 16, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:17, 18, y 19, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:20, 21, y 6, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende

una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:17, 18, y 19, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:20, 21, y 6, respectivamente.

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45. En otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46. En aun otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras

modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:24, 30, 32, 34, o 40; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:25, 31, 33, 35, y 41, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:26, 36, o 42; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:27, 37, o 43; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:28, 38, o 44; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.:29 o 39. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En

algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la Tabla 2.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:24, 30, 32, 34, o 50; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:25, 31, 33, 35, y 41, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:26, 36, o 42; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:27, 37, o 43; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:28, 38, o 44; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29 o 39.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:25, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:30, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:31, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:32, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:33, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:34, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:35, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:36, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:37, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:38, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:39.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:40, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:41, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:42, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:43, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:24, 25, y 26, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:27, 28, y 29, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:24, 25, y 26, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:27, 28, y 29, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una

HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:30, 31, y 26, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de ident. de sec. de las sec. con núms. de ident.:27, 28, y 29, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:30, 31, y 26, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. de ident. sec. con núms. de ident.:27, 28, y 29, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:32, 33, y 26, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:27, 28, y 29, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:32, 33, y 26, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:27, 28, y 29, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:34, 35, y 36, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:37, 38, y 39, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:34, 35, y 36, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:37, 38, y 39, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:40, 41, y 42, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:43, 44, y 29, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:40, 41, y 42, respectivamente, y (ii) una VL que comprende

una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:43, 44, y 29, respectivamente.

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68. En otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69 o 70. En aun otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69 o 70. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:47, 53, 55, 57, o 63; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:48, 54, 56, 58, y 64, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:49, 59, o 65; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:50, 60, o 66; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:51, 61, o 67; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.:52 o 62. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 3** o la **Tabla 4**.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:47, 53, 55, 57, o 63; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:48, 54, 56, 58, y 64, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:49, 59, o 65; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:50, 60, o 66; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:51, 61, o 67; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52 o 62.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:47, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:48, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:53, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:54, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:55, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:56, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:57, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:58, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:59, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:60, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:61, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:62.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.:63, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:64, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:65, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:66, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de QIS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:47, 48, y 49, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:50, 51, y 52, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:47, 48, y 49, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:50, 51, y 52, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:53, 54, y 49, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms.

de ident.:50, 51, y 52, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:53, 54, y 49, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:50, 51, y 52, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:55, 56, y 49, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:50, 51, y 52, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:55, 56, y 49, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:50, 51, y 52, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:57, 58, y 59, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una

LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:60, 61, y 62, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:57, 58, y 59, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:60, 61, y 62, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:63, 64, y 65, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:66, 67, y 52, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:63, 64, y 65, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:66, 67, y 52, respectivamente.

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91. En otra

modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92. En aun otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:71, 77, 79, 81 o 87; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:72, 78, 80, 82, y 88, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:73, 83 o 89; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:74, 84 o 90; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:75, 85 o 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.:76 o 86. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 5**.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:71, 77, 79, 81 o 87; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de

ident.:72, 78, 80, 82, o 88, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:73, 83 o 89; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:74, 84 o 90; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:75, 85 o 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76 o 86.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:71, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:72, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:77, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:78, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:79, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:80, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:81, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:82, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:83, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:84, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:85, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:87, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:88, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:89, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:90, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:71, 72, y 73, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:74, 75, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:71, 72, y 73, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:74, 75, y 76, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:77, 78, y 73, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:74, 75, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:77, 78, y 73, respectivamente, y (ii) una VL que comprende

una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:74, 75, y 76, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:79, 80, y 73, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:74, 75, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:79, 80, y 73, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:74, 75, y 76, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:81, 82, y 83, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:84, 85, y 86, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de

las sec. con núms. de ident.:81, 82, y 83, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:84, 85, y 86, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:87, 88, y 89, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:90, 21, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:87, 88, y 89, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:90, 21, y 76, respectivamente.

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113. En otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114 o 115. En aun otra modalidad, la región de

unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114 o 115. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:93, 99, 101, 103, o 109; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:94, 100, 102, 104, y 110, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:95, 105, o 111; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:96, 106 o 112; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:97, 107 o 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.:98 o 108. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 6** o la **Tabla 7**.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:93, 99, 101, 103 o 109; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:94, 100, 102, 104, y 110, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:95, 105 o 111; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:96, 106 o

112; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:97, 107 o 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98 o 108.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:93 la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:94, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:99, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:100, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:101, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:102, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:103, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:104, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:105, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:106, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:107, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:108.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:109, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:110, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:111, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:112, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:93, 94, y 95, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región

de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:96, 97, y 98, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:93, 94, y 95, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:96, 97, y 98, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:99, 100, y 95, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:96, 97, y 98, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:99, 100, y 95, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:96, 97, y 98, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:101,

102, y 95, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:96, 97, y 98, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:101, 102, y 95, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:96, 97, y 98, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:103, 104, y 105, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:106, 107, y 108, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:103, 104, y 105, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:106, 107, y 108, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una

HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:109, 110, y 111, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:112, 21, y 98, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:109, 110, y 111, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:112, 21, y 98, respectivamente.

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134. En otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135 o 136. En aun otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una

LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135 o 136. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:116, 121, 123, 125 o 130; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:117, 122, 124, 126, y 131, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:118, 127 o 132; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:119, 127 o 132; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia

de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:5, 15 o 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.:120 o 129. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 8**.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:116, 121, 123, 125 o 130; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:117, 122, 124, 126, o 131, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:118, 127 o 132; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:119, 127 o 132; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:5, 15 o 21; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120 o 129.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:116, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:117, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:121, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:122, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:123, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:124, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:125, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:126, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:127, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:128, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:129.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:130, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:131, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:132, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:133, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:116, 117, y 118, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:119, 5, y 120, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que

comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:116, 117, y 118, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:119, 5, y 120, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:121, 122, y 118, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:119, 5, y 120, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:121, 122, y 118, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:119, 5, y 120, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:123, 124, y 118, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:119, 5, y 120, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se

proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:123, 124, y 118, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:119, 5, y 120, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:125, 126, y 127, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:128, 15, y 129, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:125, 126, y 127, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:128, 15, y 129, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:130, 131, y 132, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec.

con núms. de ident.:133, 21, y 120, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:130, 131, y 132, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:133, 21, y 120, respectivamente.

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158. En otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159. En aun otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas

modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:137, 143, 145, 147 o 153; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:138, 144, 146, 148 o 154; (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:139, 149 o 155; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:140, 150 o 156; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:141, 151 o 157; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %,

86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.:142 o 152. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 10**.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:137, 143, 145, 147 o 153; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:138, 144, 146, 148 o 154; (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:139, 149 o 155; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:140, 150 o 156; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:141, 151 o 157; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142 o 152.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:137, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:138, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:143, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:144, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:145, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:146, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:147, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:148, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:149, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:150, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:151, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:152.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:153, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:154, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:155, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:156, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de AAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:137, 138, y 139, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:140, 141, y 142, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:137, 138, y 139, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:140, 141, y 142, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:143, 144, y 139, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:140, 141, y 142, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:143, 144, y 139, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:140, 141, y 142, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:145, 146, y 139, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:140, 141, y 142, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:145, 146, y 139, respectivamente, y (ii) una

VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:140, 141, y 142, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:147, 148, y 149, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:150, 151, y 152, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:147, 148, y 149, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:150, 151, y 152, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:153, 154, y 155, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:156, 157, y 142, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de

aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:153, 154, y 155, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:156, 157, y 142, respectivamente.

En una modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177. En otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178. En aun otra modalidad, la región de unión a ENPP3 comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3, respectivamente, de una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3, respectivamente, de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras

modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:1, 164, 166, 11, o 172; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:160, 165, 167, 168, y 173, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:161, 169 o 174; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:162, 170 o 175; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:163, 171 o 176; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con las sec. con núms. de ident.:76 o 86. En

algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 11**.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:1, 164, 166, 11 o 172; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:160, 165, 167, 168, o 173, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:161, 169 o 174; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:162, 170 o 175; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:163, 171 o 176; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76 o 86.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:160, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:164, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:165, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:166, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:167, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:168, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:169, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:170, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:171, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:172, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:173, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:174, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:175, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de VAS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:1, 160, y 161, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:162, 163, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:1, 160, y 161, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:162, 163, y 76, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una

HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:164, 165, y 161, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:162, 163, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:164, 165, y 161, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:162, 163, y 76, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:166, 167, y 161, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:162, 163, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:166, 167, y 161, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:162, 163, y 76, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:11, 168, y 169, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:170, 171, y 86, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:11, 168, y 169, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:170, 171, y 86, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:172, 173, y 174, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:175, 176, y 76, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:172, 173, y 174, respectivamente, y (ii) una

VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:175, 176, y 76, respectivamente.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 comprende además una o más regiones marco de la VH o VL que tienen la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de la sec. con núm. de ident.:22, sec. con núm. de ident.:23, sec. con núm. de ident.:45, sec. con núm. de ident.:46, sec. con núm. de ident.:68, sec. con núm. de ident.:69, sec. con núm. de ident.:70, sec. con núm. de ident.:91, sec. con núm. de ident.:92, sec. con núm. de ident.:113, sec. con núm. de ident.:114, sec. con núm. de ident.:115, sec. con núm. de ident.:134, sec. con núm. de ident.:135, sec. con núm. de ident.:136, sec. con núm. de ident.:158, sec. con núm. de ident.:159, sec. con núm. de ident.:177, y sec. con núm. de ident.:178. Las regiones marco descritas en la presente se determinan basadas en los límites del sistema de numeración de CDR. En otras palabras, si las CDR se determinan mediante, p. ej., Kabat, IMGT o Chothia, entonces las regiones marco son los residuos de aminoácidos que rodean las CDR en la región variable en el formato, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Por ejemplo, FR1 se define como los residuos de aminoácidos del extremo N-terminal a los residuos de aminoácido de CDR1 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR2 se define como los residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácido de CDR1 y CDR2 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR3 se define como los residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácidos de CDR2 y CDR3 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de

Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; y FR4 se define como los residuos de aminoácidos del extremo C-terminal a los residuos de aminoácidos de CDR3 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de

unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.:113. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:136. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:136.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a ENPP3, que comprende: (i) una VH que

tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y (ii) una VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178.

En ciertas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende secuencias de aminoácidos con cierto porcentaje de identidad en relación con cualquier región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente (tal como en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9, Tabla 10, y Tabla 11).

La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias (p. ej*.,* secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico) puede lograrse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268 (1990), modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877 (1993). Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403 (1990). Las búsquedas de nucleótidos por BLAST pueden realizarse con el conjunto de parámetros del programa de nucleótidos NBLAST, p. ej*.,* para puntaje = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el conjunto de parámetros del programa XBLAST, p. ej*.,* para puntaje = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en la presente. Para obtener alineamientos interrumpidos para fines de comparación, puede usarse el programa Gapped BLAST según se describe en *Altschul et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389 3402 (1997). Alternativamente, el programa PSI BLAST puede usarse para

realizar una búsqueda iterativa que detecta las distintas relaciones entre moléculas (*Id.*). Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas (p. ej*.,* XBLAST y NBLAST) (ver, p. ej*.,* National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la red mundial, ncbi.nlm.nih.gov). Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS 4:11-17 (1998). Tal algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se usa el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, pueden usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de espacio de 12, y una penalización por espacio de 4. La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse mediante técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir espacios. Para calcular la identidad porcentual, típicamente solo se cuentan las coincidencias exactas.

En algunas modalidades, la región de unión a la ENPP3 proporcionada en la presente contiene sustituciones (*p. ej*., sustituciones conservativas), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero la región de unión a la ENPP3 que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a la ENPP3. En algunas modalidades, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de referencia. En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones, o deleciones ocurren en regiones fuera de las CDR (*es decir*, en las FR). Opcionalmente, la región de unión a la ENPP3 proporcionada en la presente incluye modificaciones posteriores a la traducción de una secuencia de referencia.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92. En algunas

modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec.

con núm. de ident.:134, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:136. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159. En algunas

modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.

con núm. de ident.:68, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:136. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.:158, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la

presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:136. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une específicamente a ENPP3 competitivamente con una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178.

Tabla 1: Secuencias de la región de unión a NPP3B56

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	DYSMN (sec. con núm. de ident.: 1)	GFTFSDY (sec. con núm. de ident.:7)	GFTFSDYSMN (sec. con núm. de ident.: 9)	SDYSMN (sec. con núm. de ident.: 11)	GFTFSDYS (sec. con núm. de ident.: 17)
Región variable de cadena pesada CDR2	SISSISSYVKYADSVKG (sec. con núm. de ident.: 2)	SSISSY (sec. con núm. de ident.:8)	SISSISSYVK (sec. con núm. de ident.:10	WVSSISSISSYVK (sec. con núm. de ident.: 12)	ISSISSYV (sec. con núm. de ident.: 18)
Región variable de cadena pesada CDR3	GHYFDY (sec. con núm. de ident.:3)	GHYFDY (sec. con núm. de ident.:3)	GHYFDY (sec. con núm. de ident.:3)	ARGHYFD (sec. con núm. de ident.: 13)	ARGHYFDY (sec. con núm. de ident.: 19)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQSVSSNLA (sec. con núm. de ident.: 4)	RASQSVSSNLA (sec. con núm. de ident.: 4)	RASQSVSSNLA (sec. con núm. de ident.: 4)	SSNLAWY (sec. con núm. de ident.: 14)	QSVSSN (sec. con núm. de ident.:20)
Región variable de cadena ligera CDR2	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	LLIYGASTRA (sec. con núm. de ident.: 15)	GAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.:6)	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.:6)	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.:6)	QQYNNWPR (sec. con núm. de ident.:16)	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.:6)
VH (sec. con núm. de ident.:22): EVQLVESGGGRVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSISSYVKYADSVKGRFTMSRDNAKNSLFLQMNSLRDEDMAVYYCARGHYFDYWGQGTLVTVSS					
Secuencia de ADN que codifica VH (sec. con núm. de ident.:316) GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGAAGAGTGAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCTCCGACTACTCCATGAACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCTCTATCTCCTCCATCTCCAGCTACGTGAAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATGTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTTCCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGACGAGGACATGGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCCACTACTTCGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTCTCTTCT					
VL (sec. con núm. de ident.:23):					

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGLAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVEIK
Secuencia de ADN que codifica VL (sec. con núm. de ident.:317) GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGAGAGCTACCCTGTCTTGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCCTCCAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCTCCCCGGCTGTTGATCTATGGCGCTTCTACCAGAGCCACAGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGTCCGAGGATTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACAACAACTGGCCCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

Tabla 2: Secuencias de la región de unión a NPP3B86

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	NYYIF (sec. con núm. de ident.: 24)	GYTVTNY (sec. con núm. de ident.: 30)	GYTVTNYYIF (sec. con núm. de ident.:32)	TNYYIF (sec. con núm. de ident.:34)	GYTVTNYY (sec. con núm. de ident.: 40)
Región variable de cadena pesada CDR2	WINPNSGGTNYAQKFQG (sec. con núm. de ident.: 25)	NPNSGG (sec. con núm. de ident.:31)	WINPNSGGTN (sec. con núm. de ident.: 33)	WMGWINPNSGGTN (sec. con núm. de ident.: 35)	INPNSGGT (sec. con núm. de ident.: 41)
Región variable de cadena pesada CDR3	GGYSGYALSSHYGMDV (sec. con núm. de ident.: 26)	GGYSGYALSSHYGMDV (sec. con núm. de ident.: 26)	GGYSGYALSSHYGMDV (sec. con núm. de ident.: 26)	ARGGYSGYALSSHYGMD (sec. con núm. de ident.:36)	ARGGYSGYALSSHYGMDV (sec. con núm. de ident.: 42)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQSVSSSYLA (sec. con núm. de ident.: 27)	RASQSVSSSYLA (sec. con núm. de ident.: 27)	RASQSVSSSYLA (sec. con núm. de ident.: 27)	SSSYLAWY (sec. con núm. de ident.:37)	QSVSSSY (sec. con núm. de ident.: 43)
Región variable de cadena ligera CDR2	DASSRAT (sec. con núm. de ident.: 28)	DASSRAT (sec. con núm. de ident.: 28)	DASSRAT (sec. con núm. de ident.: 28)	LLIYDASSRA (sec. con núm. de ident.:38)	DAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQYDSSPLT (sec. con núm. de ident.: 29)	QQYDSSPLT (sec. con núm. de ident.: 29)	QQYDSSPLT (sec. con núm. de ident.: 29)	QQYDSSPL (sec. con núm. de ident.: 39)	QQYDSSPLT (sec. con núm. de ident.: 29)
VH (sec. con núm. de ident.:45) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTVTNYYIFWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMKLSRLGSDDTAVYYCARGGYSGYALSSHYGMDVWGQGTMVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.:46) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLIISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPLTFGGGTKVEIK					

Tabla 3: Secuencias de la región de unión a NPP3B64

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT

Región variable de cadena pesada CDR1	TYYIH (sec. con núm. de ident.: 47)	GYTFTTY (sec. con núm. de ident.: 53)	GYTFTTYYIH (sec. con núm. de ident.: 55)	TTYYIH (sec. con núm. de ident.: 57)	GYTFTTYY (sec. con núm. de ident.: 63)
Región variable de cadena pesada CDR2	IINPSGGSTNYAQKFQG (sec. con núm. de ident.: 48)	NPSGGS (sec. con núm. de ident.: 54)	IINPSGGSTN (sec. con núm. de ident.: 56)	WMGIINPSGGSTN (sec. con núm. de ident.: 58)	INPSGGST (sec. con núm. de ident.: 64)
Región variable de cadena pesada CDR3	DYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 49)	DYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 49)	DYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 49)	ARDYYYYYYGMD (sec. con núm. de ident.: 59)	ARDYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 65)
Región variable de cadena ligera CDR1	RSSQSLVRNGGYTYLN (sec. con núm. de ident.: 50)	RSSQSLVRNGGYTYLN (sec. con núm. de ident.: 50)	RSSQSLVRNGGYTYLN (sec. con núm. de ident.: 50)	VRNGGYTYLNWL (sec. con núm. de ident.: 60)	QSLVRNGGYTY (sec. con núm. de ident.:66)
Región variable de cadena ligera CDR2	QISNRFS (sec. con núm. de ident.: 51)	QISNRFS (sec. con núm. de ident.: 51)	QISNRFS (sec. con núm. de ident.: 51)	LLIYQISNRF (sec. con núm. de ident.: 61)	QIS
Región variable de cadena ligera CDR3	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)	MQATQFPH (sec. con núm. de ident.: 62)	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)
VH (sec. con núm. de ident.:68) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTNYAQKFQGRVTMTRDTSTRIVYMELGSLRSEDTAVYYCARDYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.:69) DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVRNGGYTYLNWLQQRPGQPPRLLIYQISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLTISRVEAEDVGVYYCMQATQFPHTFGQGTKLEIK					

Tabla 4: Secuencias de la región de unión a NPP3B68

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	TYYIH (sec. con núm. de ident.: 47)	GYTFTTY (sec. con núm. de ident.: 53)	GYTFTTYYIH (sec. con núm. de ident.: 55)	TTYYIH (sec. con núm. de ident.: 57)	GYTFTTYY (sec. con núm. de ident.: 63)
Región variable de cadena pesada CDR2	IINPSGGSTNYAQKFQG (sec. con núm. de ident.: 48)	NPSGGS (sec. con núm. de ident.: 54)	IINPSGGSTN (sec. con núm. de ident.: 56)	WMGIINPSGGSTN (sec. con núm. de ident.: 58)	INPSGGST (sec. con núm. de ident.: 64)
Región variable de cadena pesada CDR3	DYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 49)	DYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 49)	DYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 49)	ARDYYYYYYGMD (sec. con núm. de ident.: 59)	ARDYYYYYYGMDV (sec. con núm. de ident.: 65)
Región variable de cadena ligera CDR1	RSSQSLVRNGGYTYLN	RSSQSLVRNGGYTYLN	RSSQSLVRNGGYTYLN	VRNGGYTYLNWL (sec. con núm. de ident.: 60)	QSLVRNGGYTY

	(sec. con núm. de ident.: 50)	(sec. con núm. de ident.: 50)	(sec. con núm. de ident.: 50)		(sec. con núm. de ident.:66)
Región variable de cadena ligera CDR2	QISNRFS (sec. con núm. de ident.: 51)	QISNRFS (sec. con núm. de ident.: 51)	QISNRFS (sec. con núm. de ident.: 51)	LLIYQISNRF (sec. con núm. de ident.: 61)	QIS
Región variable de cadena ligera CDR3	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)	MQATQFPH (sec. con núm. de ident.: 62)	MQATQFPHT (sec. con núm. de ident.: 52)
VH (sec. con núm. de ident.:68) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTNYAQKFQGRVTMTRDTST RIVYMELGSLRSEDTAVYYCARDYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.:70) DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVRNGGYTYLNWLQQRPGQPPRLLIYQISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFT LTISRVEAEDVGVYYCMQATQFPHTFGQGTKLEIK					

Tabla 5: Secuencias de la región de unión a NPP3B60

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	NYWIG (sec. con núm. de ident.: 71)	GYGFTNY (sec. con núm. de ident.: 77)	GYGFTNYWIG (sec. con núm. de ident.: 79)	TNYWIG (sec. con núm. de ident.: 81)	GYGFTNYW (sec. con núm. de ident.: 87)
Región variable de cadena pesada CDR2	IIYPSDSNTRYS PSFQG (sec. con núm. de ident.:72)	YPSDSN (sec. con núm. de ident.: 78)	IIYPSDSNTR (sec. con núm. de ident.: 80)	WMGIIYPSDSNTR (sec. con núm. de ident.: 82)	IYPSDSNT (sec. con núm. de ident.: 88)
Región variable de cadena pesada CDR3	QNYYYYTMDV (sec. con núm. de ident.: 73)	QNYYYYTMDV (sec. con núm. de ident.: 73)	QNYYYYTMDV (sec. con núm. de ident.: 73)	TRQNYYYYTMD (sec. con núm. de ident.: 83)	TRQNYYYYT MDV (sec. con núm. de ident.: 89)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQVIRSYLA (sec. con núm. de ident.: 74)	RASQVIRSYLA (sec. con núm. de ident.: 74)	RASQVIRSYLA (sec. con núm. de ident.: 74)	RSYLAWY (sec. con núm. de ident.: 84)	QVIRSY (sec. con núm. de ident.: 90)
Región variable de cadena ligera CDR2	GASTLQS (sec. con núm. de ident.: 75)	GASTLQS (sec. con núm. de ident.: 75)	GASTLQS (sec. con núm. de ident.: 75)	LLIYGASTLQ (sec. con núm. de ident.: 85)	GAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQLNSYPR (sec. con núm. de ident.: 86)	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)
VH (sec. con núm. de ident.:91) QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYGFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPSDSNTRYSPSFQGQVTISADKSIN TAYLQWSSLKASDTAMYYCTRQNYYYYTMDVWGQGTTVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.:92) DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQVIRSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASTLQSGFPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK					

Tabla 6: Secuencias de la región de unión a NPP3B61

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	SYYWS (sec. con núm. de ident.: 93)	GGSISSY (sec. con núm. de ident.: 99)	GGSISSYYWS (sec. con núm. de ident.: 101)	SSYYWS (sec. con núm. de ident.: 103)	GGSISSYY (sec. con núm. de ident.: 109)
Región variable de cadena pesada CDR2	RIYTTGRIYTSGYTNYNPSLKS (sec. con núm. de ident.: 94)	YTTGRIYTSGY (sec. con núm. de ident.: 100)	RIYTTGRIYTSGYTN (sec. con núm. de ident.: 102)	WIGRIYTTGRIYTSGYTN (sec. con núm. de ident.: 104)	IYTTGRIYTSGYT (sec. con núm. de ident.: 110)
Región variable de cadena pesada CDR3	GGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 95)	GGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 95)	GGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 95)	ARGGELFTDGFD (sec. con núm. de ident.: 105)	ARGGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 111)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQSVISTYLA (sec. con núm. de ident.:96)	RASQSVISTYLA (sec. con núm. de ident.:96)	RASQSVISTYLA (sec. con núm. de ident.:96)	ISTYLAWY (sec. con núm. de ident.: 106)	QSVISTY (sec. con núm. de ident.: 112)
Región variable de cadena ligera CDR2	GASSRAT (sec. con núm. de ident.:97)	GASSRAT (sec. con núm. de ident.:97)	GASSRAT (sec. con núm. de ident.:97)	LLIYGASSRA (sec. con núm. de ident.: 107)	GAS)
Región variable de cadena ligera CDR3	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)	QQYDTSPI (sec. con núm. de ident.: 108)	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)
VH (sec. con núm. de ident.:113) QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTTGRIYTSGYTNYNPSLKSRVTMSIDTSKIQFSLRLNSVTAADTAVYWCARGGELFTDGFDIWGQGTMVTVSS				
VL (sec. con núm. de ident.:114) EIVMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVISTYLAWYQQNPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDTSPITFGQGTRLEIK				

Tabla 7: Secuencias de la región de unión a NPP3B62

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	SYYWS (sec. con núm. de ident.: 93)	GGSISSY (sec. con núm. de ident.:99)	GGSISSYYWS (sec. con núm. de ident.: 101)	SSYYWS (sec. con núm. de ident.: 103)	GGSISSYY (sec. con núm. de ident.: 109)
Región variable de cadena pesada CDR2	RIYTTGRIYTSGYTNYNPSLKS (sec. con núm. de ident.: 94)	YTTGRIYTSGY (sec. con núm. de ident.: 100)	RIYTTGRIYTSGYTN (sec. con núm. de ident.: 102)	WIGRIYTTGRIYTSGYTN (sec. con núm. de ident.: 104)	IYTTGRIYTSGYT (sec. con núm. de ident.: 110)
Región variable de cadena pesada CDR3	GGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 95)	GGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 95)	GGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 95)	ARGGELFTDGFD (sec. con núm. de ident.: 105)	ARGGELFTDGFDI (sec. con núm. de ident.: 111)

Región variable de cadena ligera CDR1	RASQSVISTYLA (sec. con núm. de ident.:96)	RASQSVISTYLA (sec. con núm. de ident.:96)	RASQSVISTYLA (sec. con núm. de ident.:96)	ISTYLAWY (sec. con núm. de ident.: 106)	QSVISTY (sec. con núm. de ident.: 112)
Región variable de cadena ligera CDR2	GASSRAT (sec. con núm. de ident.:97)	GASSRAT (sec. con núm. de ident.:97)	GASSRAT (sec. con núm. de ident.:97)	LLIYGASSRA (sec. con núm. de ident.: 107)	GAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)	QQYDTSPI (sec. con núm. de ident.: 108)	QQYDTSPIT (sec. con núm. de ident.: 98)
VH (sec. con núm. de ident.:113) QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYTTGRIYTSGYTNYNPSLKSRVTMSIDTSKIQFSLRLNSVTAADTAVYWCARGGELFTDGFDIWGQGTMVTVSS				
VL (sec. con núm. de ident.:115) EIVMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVISTYLAWYQQNPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVVYYCQQYDTSPITFGQGTRLEIK					

Tabla 8: Secuencias de la región de unión a NPP3B101

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	SHYWS (sec. con núm. de ident.: 116)	GGSISSH (sec. con núm. de ident.: 121)	GGSISSHYWS (sec. con núm. de ident.: 123)	SSHYWS (sec. con núm. de ident.: 125)	GGSISSHY (sec. con núm. de ident.: 130)
Región variable de cadena pesada CDR2	NIFYSGSTNYNPSLKS (sec. con núm. de ident.: 117)	FYSGS (sec. con núm. de ident.: 122)	NIFYSGSTN (sec. con núm. de ident.: 124)	WIGNIFYSGSTN (sec. con núm. de ident.: 126)	IFYSGST (sec. con núm. de ident.: 131)
Región variable de cadena pesada CDR3	HDHVWFDP (sec. con núm. de ident.: 118)	HDHVWFDP (sec. con núm. de ident.: 118)	HDHVWFDP (sec. con núm. de ident.: 118)	ARHDHVWFD (sec. con núm. de ident.: 127)	ARHDHVWFDP (sec. con núm. de ident.: 132)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQSVSRNLV (sec. con núm. de ident.: 119)	RASQSVSRNLV (sec. con núm. de ident.: 119)	RASQSVSRNLV (sec. con núm. de ident.: 119)	SRNLVWY (sec. con núm. de ident.: 128)	QSVSRN (sec. con núm. de ident.: 133)
Región variable de cadena ligera CDR2	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	LLIYGASTRA (sec. con núm. de ident.: 15)	GAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQYNNWPPWT (sec. con núm. de ident.: 120)	QQYNNWPPWT (sec. con núm. de ident.: 120)	QQYNNWPPWT (sec. con núm. de ident.: 120)	QQYNNWPPW (sec. con núm. de ident.: 129)	QQYNNWPPWT (sec. con núm. de ident.: 120)
VH (sec. con núm. de ident.:134) QVQLQESGPGLVKTSETLSLTCTVSGGSISSHYWSWIRQPPGKGLEWIGNIFYSGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNHFSLKLISVTTADTAIYYCARHDHVWFDPWGQGTLVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.:135)					

EIVLTQSPGTLSVFPGERATLSCRASQSVSRNLVWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISSL QSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIK

Tabla 9: Secuencias de la región de unión a NPP3B100

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	SHYWS (sec. con núm. de ident.: 116)	GGSISSH (sec. con núm. de ident.: 121)	GGSISSHYWS (sec. con núm. de ident.: 123)	SSHYWS (sec. con núm. de ident.: 125)	GGSISSHY (sec. con núm. de ident.: 130)
Región variable de cadena pesada CDR2	NIFYSGSTNYN PSLKS (sec. con núm. de ident.: 117)	FYSGS (sec. con núm. de ident.: 122)	NIFYSGSTN (sec. con núm. de ident.: 124)	WIGNIFYSGSTN (sec. con núm. de ident.: 126)	IFYSGST (sec. con núm. de ident.: 131)
Región variable de cadena pesada CDR3	HDHVWFDP (sec. con núm. de ident.: 118)	HDHVWFDP (sec. con núm. de ident.: 118)	HDHVWFDP (sec. con núm. de ident.: 118)	ARHDHVWFD (sec. con núm. de ident.: 127)	ARHDHVWFD P (sec. con núm. de ident.: 132)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQSVSRNLV (sec. con núm. de ident.: 119)	RASQSVSRNLV (sec. con núm. de ident.: 119)	RASQSVSRNLV (sec. con núm. de ident.: 119)	SRNLVWY (sec. con núm. de ident.: 128)	QSVSRN (sec. con núm. de ident.: 133)
Región variable de cadena ligera CDR2	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 5)	LLIYGASTRA (sec. con núm. de ident.: 15)	GAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQYNNWPPWT (sec. con núm. de ident.: 120)	QQYNNWPPWT (sec. con núm. de ident.: 120)	QQYNNWPPWT (sec. con núm. de ident.: 120)	QQYNNWPPW (sec. con núm. de ident.: 129)	QQYNNWPPW T (sec. con núm. de ident.: 120)
VH (sec. con núm. de ident.:134) QVQLQESGPGLVKTSETLSLTCTVSGGSISSHYWSWIRQPPGKGLEWIGNIFYSGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNH FSLKLISVTTADTAIYYCARHDHVWFDPWGQGTLVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.:136) EIVLTQSPATLSVFPGERATLSCRASQSVSRNLVWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTKVEIK					

Tabla 10: Secuencias de la región de unión a NPP3B98

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	NYYWS (sec. con núm. de ident.: 137)	GGSISNY (sec. con núm. de ident.: 143)	GGSISNYYWS (sec. con núm. de ident.: 145)	SNYYWS (sec. con núm. de ident.: 147)	GGSISNYY (sec. con núm. de ident.:153)
Región variable de cadena pesada CDR2	RIYASGSTNYN PSLKS	YASGS (sec. con núm. de ident.: 144)	RIYASGSTN (sec. con núm. de ident.: 146)	WIGRIYASGSTN (sec. con núm. de ident.: 148)	IYASGST (sec. con núm. de ident.: 154)

	(sec. con núm. de ident.: 138)				
Región variable de cadena pesada CDR3	EGYSSTLYDNAFDF (sec. con núm. de ident.: 139)	EGYSSTLYDNAFDF (sec. con núm. de ident.: 139)	EGYSSTLYDNAFDF (sec. con núm. de ident.: 139)	AREGYSSTLYDNAFD (sec. con núm. de ident.: 149)	AREGYSSTLYDNAFDF (sec. con núm. de ident.: 155)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQGISTWLA (sec. con núm. de ident.: 140)	RASQGISTWLA (sec. con núm. de ident.: 140)	RASQGISTWLA (sec. con núm. de ident.: 140)	STWLAWY (sec. con núm. de ident.: 150)	QGISTW (sec. con núm. de ident.: 156)
Región variable de cadena ligera CDR2	AASSLQS (sec. con núm. de ident.: 141)	AASSLQS (sec. con núm. de ident.: 141)	AASSLQS (sec. con núm. de ident.: 141)	LLIYAASSLQ (sec. con núm. de ident.: 151)	AAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQANSFPLT (sec. con núm. de ident.: 142)	QQANSFPLT (sec. con núm. de ident.: 142)	QQANSFPLT (sec. con núm. de ident.: 142)	QQANSFPL (sec. con núm. de ident.: 152)	QQANSFPLT (sec. con núm. de ident.: 142)
VH (sec. con núm. de ident.: 158) QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNYYWSWIRQPAGKGLEWIGRIYASGSTNYNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLRLRSVTATDTAVYYCAREGYSSTLYDNAFDFWGQGTMVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.: 159) DIQMTQSPSSVSASVGGRVTITCRASQGISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK					

Tabla 11: Secuencias de la región de unión a NPP3B107

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	DYSMN (sec. con núm. de ident.: 1)	GFIFSDY (sec. con núm. de ident.: 164)	GFIFSDYSMN (sec. con núm. de ident.: 166)	SDYSMN (sec. con núm. de ident.: 11)	GFIFSDYS (sec. con núm. de ident.: 172)
Región variable de cadena pesada CDR2	SISSGSSYIYYADSLKG (sec. con núm. de ident.: 160)	SSGSSY (sec. con núm. de ident.: 165)	SISSGSSYIY (sec. con núm. de ident.:167)	WVSSISSGSSYIY (sec. con núm. de ident.: 168)	ISSGSSYI (sec. con núm. de ident.: 173)
Región variable de cadena pesada CDR3	GLDYFDY (sec. con núm. de ident.: 161)	GLDYFDY (sec. con núm. de ident.:161)	GLDYFDY (sec. con núm. de ident.:161)	VRGLDYFD (sec. con núm. de ident.: 169)	VRGLDYFDY (sec. con núm. de ident.: 174)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQDISNYLA (sec. con núm. de ident.:162)	RASQDISNYLA (sec. con núm. de ident.:162)	RASQDISNYLA (sec. con núm. de ident.:162)	SNYLAWY (sec. con núm. de ident.: 170)	QDISNY (sec. con núm. de ident.: 175)
Región variable de cadena ligera CDR2	VASTLQS (sec. con núm. de ident.:163)	VASTLQS (sec. con núm. de ident.:163)	VASTLQS (sec. con núm. de ident.:163)	LLIYVASTLQ (sec. con núm. de ident.: 171)	VAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQLNSYPR (sec. con núm. de ident.: 86)	QQLNSYPRT (sec. con núm. de ident.: 76)

VH (sec. con núm. de ident.:177) EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSDYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSLKGRFTISRDNAKN SLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRGLDYFDYWGQGALVTVSS
VL (sec. con núm. de ident.:178) DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGRAPKLLIYVASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK

Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En algunas modalidades, tras la unión a la molécula de ENPP3, la presente molécula de unión a ENPP3 se une a la célula que expresa la proteína ENPP3. En algunas modalidades, la célula que expresa ENPP3 es una célula cancerosa. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se

une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la

presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a ENPP3 que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178.

5.4 Anticuerpos

En algunas modalidades, los agentes de unión a ENPP3 descritos en la presente son anticuerpos anti-ENPP3. En algunas modalidades, los agentes de unión a ENPP3 descritos en la presente comprenden uno o más dominios o fragmentos derivados de un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo anti-ENPP3). En algunas modalidades, los agentes de unión a ENPP3 descritos en la presente pueden generarse con métodos y procesos para la generación, selección, modificación y fragmentación, *etc.*, de moléculas de anticuerpos conocidas en la técnica.

5.4.1 Anticuerpos policlonales

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ENPP3 de la presente descripción pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la técnica. Los anticuerpos

policlonales pueden cultivarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples. El agente inmunizante puede incluir un polipéptido de ENPP3 o una proteína de fusión de este. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se inmuniza o inmunizar el mamífero con la proteína y uno o más adyuvantes. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de poroto de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden usarse incluyen Ribi, CpG, Poly 1C, adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (lípido A de monofosforilo, dicorinomicolato de trehalosa sintética). Un experto en la técnica puede seleccionar el protocolo de inmunización sin demasiada experimentación. A continuación, se puede sangrar al mamífero y analizar el suero para determinar el título de anticuerpos ENPP3. Si se desea, el mamífero puede reforzarse hasta que el título del anticuerpo aumente o se estabilice. Adicional o alternativamente, pueden obtenerse linfocitos del animal inmunizado para la fusión y preparación de anticuerpos monoclonales a partir de hibridoma, como se describe a continuación.

5.4.2 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la presente descripción pueden ser de manera alternativa anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse usando el método de hibridoma descrito primero por Kohler *et al.*, 1975,

Nature 256:495-97, o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante (ver, *p. ej.,* patente de los EE. UU. núm. 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped adecuado, tal como un hámster, se inmuniza como se describió anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. En algunas modalidades, el antígeno inmunizante es una proteína humana o un fragmento de esta. En algunas modalidades, el antígeno inmunizante es una proteína de ratón o un fragmento de esta. En algunas modalidades, el antígeno inmunizante es una proteína de cyno o un fragmento de esta. Después de la inmunización, las células se aíslan y después se fusionan con una línea celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice 59-103 (1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, que, en ciertas modalidades, contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también denominadas compañeras de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT, por sus siglas en inglés), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá, típicamente, hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que evitan el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT.

Las células de mieloma compañeras de fusión ilustrativas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción estable de alto nivel de anticuerpo

por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que se selecciona contra las células parentales no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma ilustrativas son líneas de mieloma murino, tales como SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection (Manassas, VA), y aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, CA). También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, 1984, Immunol. 133:3001-05; y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (1987)).

El medio de cultivo en el cual crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridomas se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como el RIA o ELISA. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson *et al.*, 1980, Anal. Biochem. 107:220-39.

Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse al limitar los procedimientos de dilución y cultivarse mediante métodos estándar (Goding, *supra*). Los materiales de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, DMEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma

pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascitis en un animal, por ejemplo, mediante la inyección i.p. de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía por afinidad (p. ej., usando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Tales células de hibridoma pueden servir como una fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de cualquier otra manera no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, 1993, Curr. Opinion in Immunol. 5:256-62 y Plückthun, 1992, Immunol. Revs. 130:151-88.

En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a un epítopo de ENPP3 comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio VH y/o una secuencia de aminoácidos de un dominio VL codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con (1) el complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera

de los dominios VH y/o VL descritos en la presente en condiciones rigurosas (*p. ej.,* hibridación a ADN unido por filtro en cloruro sódico 6X/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X/0,1 % SDS a aproximadamente 50-65 °C), en condiciones altamente rigurosas (p. ej., hibridación a ácido nucleico unido por filtro en SSC 6X a aproximadamente 45 °C seguida por uno o más lavados en SSC 0,1X/0,2 % SDS a aproximadamente 68 °C) o en otras condiciones rigurosas de hibridación conocidas para los expertos en la técnica. *Ver, p. ej.*, Current Protocols in Molecular Biology Vol. I, 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3 (Ausubel *et al.* eds., 1989).

En algunas modalidades, un anticuerpo que se une a un epítopo de ENPP3 comprende una secuencia de aminoácidos de una HCDR o una secuencia de aminoácidos de una LCDR representada en las **Tablas 1-11** en condiciones rigurosas (*p. ej*., hibridación al ADN unido a filtro en SSC 6X a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC 0,1 % de SDS a aproximadamente 50-65 °C), en condiciones altamente rigurosas (*p. ej.,* hibridación al ácido nucleico unido a filtro en SSC 6X a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en SSC 0,1X /0,2 % de SDS a aproximadamente 68 °C), o en otras condiciones rigurosas de hibridación conocidas por los expertos en la técnica (*ver, p. ej.,* Ausubel *et al.*, *supra*).

En una modalidad adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las genotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Antibody Phage Display: Methods and Protocols (O'Brien and Aitken eds., 2002). En principio, los clones de los anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante la revisión de las genotecas de fagos que contienen fagos que exhiben varios fragmentos de la región variable de anticuerpos (Fv) fusionados a la

proteína de cubierta del fago. Tales genotecas de fagos se revisan contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y por lo tanto separados de los clones sin unión en la genoteca. Después, los clones de unión se eluyen del antígeno y pueden enriquecerse aún más mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno.

Los dominios variables pueden mostrarse funcionalmente en los fagos, ya sea como fragmentos Fv (scFv) de cadena sencilla, en los cuales la VH y VL se unen covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los cuales cada uno se fusiona a un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe, por ejemplo, en Winter *et al.*, 1994, Ann. Rev. Immunol. 12:433-55.

Los repertorios de los genes VH y VL pueden clonarse por separado por PCR y recombinarse aleatoriamente en genotecas de fagos que después pueden buscarse en los clones de unión al antígeno como se describe en Winter *et al.*, *supra*. Las genotecas provenientes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio sin tratamiento previo puede clonarse para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos para un rango amplio de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización, como se describe en Griffiths *et al.*, 1993, EMBO J 12:725-34. Por último, las genotecas sin tratamiento previo también pueden elaborarse sintéticamente mediante la clonación de segmentos de genes V no reordenados provenientes de células madre y usando cebadores en PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, como se describe, por ejemplo, en Hoogenboom y Winter, 1992, J. Mol. Biol. 227:381-88.

El análisis de las genotecas puede realizarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, ENPP3 (p. ej., un polipéptido, fragmento o epítopo de ENPP3) puede usarse para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, puede expresarse en las células huésped fijadas a las placas de adsorción o usarse en la clasificación celular, puede conjugarse con biotina para la captura con glóbulos recubiertos con estreptavidina, o puede usarse en cualquier otro método de adsorción de genotecas de exhibición. La selección de los anticuerpos con cinética de disociación lenta (p. ej., afinidades de unión adecuadas) puede promoverse usando lavados largos y la exhibición en fagos monovalentes, como se describe en Bass *et al.*, 1990, Proteins 8:309-14 y WO 92/09690, y usando una densidad de revestimiento baja de antígeno como se describe en Marks *et al.*, 1992, Biotechnol. 10:779-83.

Los anticuerpos anti-ENPP3 pueden obtenerse mediante el diseño de un procedimiento de selección de antígenos adecuados para la selección del clon de fago de interés, seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-ENPP3 en toda su extensión usando las secuencias de VH y/o VL (p. ej., las secuencias de Fv), o varias secuencias de la CDR de las secuencias de VH y la VL, del clon de fago de interés y las secuencias de la región constante (p. ej., Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *supra*.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-ENPP3 se genera usando métodos como se describe en Bowers *et al.*, 2011, Proc Natl Acad Sci USA. 108:20455-60, *p. ej.*, la plataforma SHM-XHL™ (AnaptysBio, San Diego, CA). En breve, en este método, se construye una genoteca completamente humana de la IgG en una línea celular de mamífero (p. ej., HEK293) como una genoteca de partida. Se seleccionan las células de mamíferos que presentan inmunoglobulinas que se unen a un péptido o epítopo diana (p.

ej., mediante clasificación FACS) y, a continuación, se reproduce in vitro la hipermutación somática inducida por activación de la citidina deaminasa (AID) para ampliar la diversidad del conjunto de anticuerpos seleccionados inicialmente. Después de varias rondas de maduración de la afinidad al acoplar la exhibición de superficie de células de mamíferos con hipermutación somática *in vitro*, se generan anticuerpos anti-ENPP3 de alta afinidad y alta especificidad. Otros métodos que pueden usarse para generar genotecas de anticuerpos y/o maduración de afinidad de anticuerpos se describen, p. ej., en las patentes de los EE. UU. núms. 8.685.897 y 8.603.930, y las publicaciones de los EE. UU. núms. 2014/0170705, 2014/0094392, 2012/0028301, 2011/0183855 y 2009/0075378, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia.

5.4.3 Fragmentos de anticuerpo

La presente descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a ENPP3. En determinadas circunstancias, existen ventajas al usar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede conducir a un acceso mejorado a las células, tejidos u órganos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, ver Hudson *et al.*, 2003, Nature Med. 9:129-34.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, p. ej., Morimoto *et al.*, 1992, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-17; y Brennan *et al.*, 1985, Science 229:81-83). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, scFv y spFv pueden

todos expresarse en y secretarse a partir de células de *E. coli* o de levadura, lo que permite, por lo tanto, la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las genotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')2 (Carter *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:163-67). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab′)2 pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')2 con vida media in vivo aumentada que comprende residuos de epítopos de unión al receptor de salvamento se describen en, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la técnica. En ciertas modalidades, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena única (scFv) (ver, p. ej., la patente internacional núm. WO 93/16185; las patentes de los EE. UU. núms. 5.571.894 y 5.587.458). En ciertas modalidades, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario engrapado (spFv) (ver, p. ej., WO2021030657). El Fv y scFv tienen sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; Por lo tanto, pueden ser adecuados para reducir la unión no específica durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el término amino-término o carboxi-término de un scFv (ver, *p. ej.*, Borrebaeck ed., supra). El fragmento de anticuerpo también puede ser un “anticuerpo lineal”, por ejemplo, como se describe en las referencias citadas anteriormente. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos, tales como biespecíficos.

Las estructuras de unión derivadas de anticuerpos más pequeñas son los dominios variables separados (dominios V) también denominados anticuerpos de dominio variable único (sdAb). Ciertos tipos de organismos, los camélidos y peces cartilaginosos, poseen dominios tipo V únicos de alta afinidad montados en una estructura de dominio equivalente Fc como parte de su sistema inmunitario. (Woolven *et al.*, 1999, Immunogenetics 50: 98-101; y Streltsov *et al.*, 2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101:12444-49). Los dominios tipo V (denominados VhH en camélidos y V-NAR en tiburones) muestran, típicamente, bucles de superficie largos, lo que permite la penetración de cavidades de antígenos diana. También estabilizan los dominios de VH aislados al enmascarar parches de superficie hidrófobos.

Estos dominios VhH y V-NAR se han usado para diseñar por ingeniería los sdAb. Se han diseñado variantes del dominio V humano usando la selección de genotecas de fagos y otros enfoques que han resultado en dominios derivados de VL y VH de alta unión, estables.

Los anticuerpos proporcionados en la presente incluyen, pero no se limitan a, moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une a un epítopo de ENPP3. Las moléculas de inmunoglobulina proporcionadas en la presente pueden ser de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o cualquier subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de la molécula de inmunoglobulina.

Las variantes y los derivados de anticuerpos incluyen fragmentos funcionales de anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un epítopo de ENPP3. Los fragmentos funcionales ilustrativos incluyen fragmentos Fab (p. ej., un fragmento de

anticuerpo que contiene el dominio de unión al antígeno y comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada unidas por un enlace disulfuro); Fab' (p. ej., un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio único de unión al antígeno que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región bisagra); F(ab')2 (p. ej., dos moléculas Fab' unidas por enlaces disulfuro intercatenarios en las regiones bisagra de las cadenas pesadas; las moléculas de Fab' pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítopos); un Fab biespecífico (p. ej., una molécula de Fab que tiene dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales puede dirigirse a un epítopo diferente); una cadena única que comprende una región variable, también conocida como scFv (p. ej., la región determinante de unión al antígeno, variable, de una única cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas entre sí por una cadena de 10-25 aminoácidos); un Fv unido por disulfuro, o dsFv (p. ej., la región determinante de unión al antígeno, variable, de una única cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas entre sí por un enlace disulfuro); un scFv o spFv engrapado (p. ej., un scFv que comprende al menos un enlace disulfuro entre VH o VL y el enlazador); una VH camelizada (p. ej., la región determinante de unión al antígeno, variable, de una cadena pesada única de un anticuerpo en el que algunos aminoácidos en la interfaz de VH son los que se encuentran en la cadena pesada de anticuerpos de camello de origen natural); un scFv biespecífico (p. ej., una molécula de scFv o dsFv que tiene dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales puede dirigirse a un epítopo diferente); un diacuerpo (p. ej., un scFv dimerizado formado cuando el dominio de VH de un primer scFv se ensambla con el dominio de VL de un segundo scFv y el dominio de VL del primer scFv se ensambla con el dominio de VH del segundo scFv; las dos regiones de unión al

antígeno del diacuerpo pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítopos); y un triacuerpo (p. ej., un scFv trimerizado, formado de manera similar a la de un diacuerpo, pero en el que se crean tres dominios de unión al antígeno en un único complejo; los tres dominios de unión al antígeno pueden dirigirse hacia el mismo o diferentes epítopos).

En algunas modalidades, una región de unión a ENPP3 es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 es una porción de un anticuerpo intacto. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 es una molécula de anticuerpo monocatenario Fab, Fab′, F(ab′)2, Fv, (*p. ej*., scFv), moléculas de anticuerpo monocatenario engrapado (p. ej., spFv), scFv enlazado a disulfuro (dsscFv). En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 es un Fab. En otras modalidades específicas, una región de unión a ENPP3 comprende dos Fab. En otras modalidades específicas, una región de unión a ENPP3 comprende dos Fab en tándem. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 es un scFv. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 se selecciona de nanocuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio variable dual (DVD), anticuerpos de dominio variable único (p. ej., anticuerpos de camélido). Cualquiera de los dominios de VH y VL descritos en la presente que se unen a ENPP3 se puede diseñar por ingeniería genética en la molécula de unión en los varios formatos descritos anteriormente, y su unión a ENPP3 y termoestabilidad se puede evaluar usando los ensayos descritos en la presente.

En modalidades específicas, una región de unión a ENPP3 comprende un scFv que se une a ENPP3. Cualquiera de los dominios de VH y VL descritos en la presente que se unen a ENPP3 pueden diseñarse por ingeniería genética en formato

scFv en orientación VH-enlazador-VL o VL-enlazador-VH. Alternativamente, los dominios VH y VL pueden diseñarse por ingeniería genética en el formato scFv sin el uso de un enlazador en la orientación VH-VL o VL-VH. Por consiguiente, en algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un scFv que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un scFv que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un scFv que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un scFv que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH.

En modalidades particulares, la VH que forma cualquiera del scFv descrito en la presente se selecciona de las secuencias de VH descritas en cualquiera de las **Tablas 1 a 11**. En modalidades particulares, la VH que forma cualquiera de los scFv descritos en la presente se selecciona de las sec. con núms. de ident.:22, 45, 68, 91, 113, 134, 158, y 177. En modalidades particulares, la VL que forma cualquiera del scFv descrito en la presente se selecciona de las secuencias de VL descritas en cualquiera de las **Tablas 1 a 11**. En modalidades particulares, la VL que forma cualquiera de los scFv descritos en la presente se selecciona de las sec. con núms. de ident.:23, 46, 69, 70, 92, 114, 115, 135, 136, y 178. En modalidades particulares, la VH que forma cualquiera de los scFv descritos en la presente se selecciona de las sec. con núms. de ident.:22, 45, 68, 91, 113, 134, 158, y 177, y la VL que forma cualquiera de los scFv descritos en la presente se selecciona de las sec. con núms. de ident.:23, 46, 69, 70, 92, 114, 115, 135, 136, y 178.

En modalidades particulares, el scFv comprende las secuencias de VH y VL descritas en cualquiera de las **Tablas 1 a 11**. En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.: 22 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 23. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:22 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:23 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:22 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:23 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:22 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:23 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:22 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:23 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:22 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:23 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:22 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:23 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.: 45 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 46. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:45 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:46 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv.

En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:45 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:46 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:45 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:46 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:45 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:46 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:45 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:46 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:45 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:46 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:69. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:69 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:69 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:69 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:69 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas

modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:69 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:69 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:70. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:70 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:70 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:70 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:70 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:70 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:68 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:70 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente

párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:91 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:92. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:91 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:92 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:91 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:92 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:91 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:92 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:91 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:92 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:91 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:92 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:91 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:92 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:114. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:114 se fusionan directamente entre sí sin un

enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:114 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:114 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:114 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:114 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:114 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:115. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:115 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:115 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:115 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que

comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:115 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:115 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:113 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:115 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:135. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:135 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:135 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:135 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:135 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:135 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que

comprende la sec. con núm. de ident.:135 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:136. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:136 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:136 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:136 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:136 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:136 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:134 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:136 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:158 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:159. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:158 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:159 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:158 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:159 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:158 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:159 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:158 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:159 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:158 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:159 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:158 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:159 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:177 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:178. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:177 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:178 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm.

de ident.:177 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:178 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:177 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:178 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:177 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:178 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:177 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:178 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:177 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:178 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, los dominios de VH y VL identificados en la presente pueden incorporarse en un formato scFv y la unión y la termoestabilidad de scFv resultante a ENPP3 pueden evaluarse usando métodos conocidos. En algunas modalidades, la unión del scFv resultante a ENPP3 puede evaluarse usando instrumentación ProteOn XPR36, BIAcore 3000 o KinExA, ELISA o ensayos de unión competitivos conocidos por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, la unión del scFv resultante a ENPP3 puede evaluarse usando sobrenadantes purificados de scFv o *E. coli* o células lisadas que contienen el scFv expresado. En algunas modalidades, la afinidad medida de un scFv de prueba para ENPP3 puede variar si se mide en diferentes condiciones (p. ej., osmolaridad, pH). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión (p. ej., KD,

Kactivado, Kdesactivado) se hacen típicamente con condiciones estandarizadas y reguladores estandarizados. La termoestabilidad puede evaluarse al calentar el scFv de prueba a temperaturas elevadas, tales como a 50 ºC, 55 ºC o 60 ºC durante un período de tiempo, tal como 5 minutos (min), 10 min, 15 min, 20 min, 25 min o 30 min y al medir la unión del scFv de ensayo al ENPP3. Las scFv que retienen la unión comparable a ENPP3 en comparación con una muestra no calentada de scFv se denominan termoestables.

En sistemas de expresión recombinantes, el enlazador es un enlazador peptídico y puede incluir cualquier aminoácido natural. Los aminoácidos ilustrativos que pueden incluirse en el enlazador son Gly, Ser, Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His y The. El enlazador debería tener una longitud que es adecuada para enlazar la VH y la VL de tal manera que formen la conformación correcta con respecto de la otra para retener la actividad deseada, tales como unión a ENPP3.

En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 5-50 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-40 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-35 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-30 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-25 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-20 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 15-20 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 16-19 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 6 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 7 aminoácidos.

En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 8 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 9 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 10 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 11 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 12 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 13 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 14 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 15 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 16 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 17 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 18 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 19 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 20 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 21 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 22 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 23 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 24 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 25 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 26 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 27 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 28 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 29 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 30 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 31 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 32 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 33 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 34

aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 35 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 36 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 37 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 38 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 39 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de 40 aminoácidos. Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse son enlazadores ricos en Gly, enlazadores que contienen Gly y Ser, enlazadores que contienen Gly y Ala, enlazadores que contienen Ala y Ser, y otros enlazadores flexibles.

Otras secuencias del enlazador pueden incluir porciones del área de bisagra de la inmunoglobulina, CL o CH1 derivado de cualquier isotipo de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera. Alternativamente, como enlazadores puede usarse una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse se muestran en la **Tabla 12**. Se describen enlazadores adicionales, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núm. WO2019/060695.

Tabla 12 Ejemplos de secuencias de enlazador

Nombre del enlazador	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
Enlazador 1	GGSEGKSSGSGSESKSTGGS	258
Enlazador 2	GGGSGGGS	259
Enlazador 3	GGGSGGGSGGGS	260
Enlazador 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	261
Enlazador 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	262
Enlazador 6	GGGGSGGGGSGGGGS	263
Enlazador 7	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	264
Enlazador 8	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	265
Enlazador 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	266

Enlazador 10	IRPRAIGGSKPRVA	267
Enlazador 11	GKGGSGKGGSGKGGS	268
Enlazador 12	GGKGSGGKGSGGKGS	269
Enlazador 13	GGGKSGGGKSGGGKS	270
Enlazador 14	GKGKSGKGKSGKGKS	271
Enlazador 15	GGGKSGGKGSGKGGS	272
Enlazador 16	GKPGSGKPGSGKPGS	273
Enlazador 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	274
Enlazador 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	275
Enlazador 19	STAGDTHLGGEDFD	276
Enlazador 20	GEGGSGEGGSGEGGS	277
Enlazador 21	GGEGSGGEGSGGEGS	278
Enlazador 22	GEGESGEGESGEGES	279
Enlazador 23	GGGESGGEGSGEGGS	280
Enlazador 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	281
Enlazador 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	282
Enlazador 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	283
Enlazador 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	284
Enlazador 28	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	285
Enlazador 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	286
Enlazador 30	GSGS	287
Enlazador 31	APAPAPAPAP	288
Enlazador 32	APAPAPAPAPAPAPAPAP	289
Enlazador 33	AEAAAKEAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKAAA	290
Enlazador 34	GTEGKSSGSGSESKST	291
Enlazador 35	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	292

En modalidades particulares, el scFv comprende, desde el término N a C, una VH, un primer enlazador (L1) y una VL (VH-L1-VL). En modalidades particulares, el scFv comprende, desde el término N a C, la VL, el L1 y la VH (VL-L1-VH). En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 258. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 259. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 260. En

modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 261. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 262. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 263. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 264. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 265. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 266. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 267. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 268. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 269. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 270. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 271. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 272. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 273. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 274. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 275. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 276. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 277. En modalidades particulares, el L1

comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 278. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 279. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 280. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 281. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 282. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 283. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 284. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 285. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 286. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 287. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 288. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 289. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 290. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 291. En modalidades particulares, el L1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 292.

En modalidades particulares, el spFv comprende un enlazador que comprende al menos un residuo Cys que funciona como un punto de anclaje para formar un enlace

disulfuro entre el enlazador y la VH, la VL o ambas de VH y VL. En una modalidad, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 292.

5.4.4 Anticuerpos multivalentes

Sin limitarse a ninguna teoría, se contempla que un anticuerpo multivalente se pueda internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo monovalente mediante una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos, y un anticuerpo multivalente con tres o más sitios de unión al antígeno se pueden internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente. En algunas modalidades, los agentes de unión de la presente descripción pueden ser un anticuerpo bivalente con dos sitios de unión al antígeno. En algunas modalidades, los agentes de unión de la presente descripción pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (*p. ej.*, anticuerpos tetravalentes). En algunas modalidades, los anticuerpos multivalentes pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más parátopos. En ciertas modalidades, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más parátopos aminoterminales a la región Fc. En ciertas modalidades, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho parátopos. En tal modalidad, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro parátopos. En algunas modalidades, el anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (*p. ej.*, dos cadenas polipeptídicas), en donde la(s)

cadena(s) polipeptídica(s) comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en la presente puede comprender además al menos dos (*p. ej.*, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en la presente puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio de CL.

En modalidades específicas, los agentes de unión multivalentes descritos en la presente comprenden una o más estructuras $sc(Fv)_2$ bivalentes. En modalidades particulares, cualquiera de los dominios VH y VL identificados en la presente también puede usarse para generar estructuras sc(Fv)2 bivalentes, como en el formato bivalente de VH-enlazador-VL-enlazador-VL-enlazador-VH, VH-enlazador-VL-enlazador-VH-enlazador-VL, VH-enlazador-VH-enlazador-VL, VL-enlazador-VH-enlazador-VH, VL-enlazador-VH, VL-enlazador-VL-enlazador-VH, o VL-enlazador-VL-enlazador-VH-enlazador-VH. En modalidades específicas, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL-enlazador-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3

descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-enlazador-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VH-enlazador-VL-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH-enlazador-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-enlazador-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VL-enlazador-VH-enlazador-VH.

Alternativamente, el uso de uno o más enlazadores en la sc(Fv)2 Las estructuras descritas en la presente pueden evitarse, y dos de los dominios VH y VL pueden unirse directamente. En consecuencia, en algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende una sc(Fv)2 que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-enlazador-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL-enlazador-VL-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)$_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-enlazador-VL-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3

descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL-VL-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)2 que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-VL-VH.

En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-enlazador-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL-enlazador-VH-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-enlazador-VH-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VL-VH-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)2 que se une a ENPP3 en el formato de VH-VL-VH-VL.

En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VH-enlazador-VL-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VH-VL-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VH-

enlazador-VL-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VH-VL-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-VH-enlazador-VL-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VH-enlazador-VH-VL-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)2 que se une a ENPP3 en el formato de VH-VH-VL-VL.

En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-enlazador-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH-enlazador-VH-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-enlazador-VH-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH-VH-VL. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)2 que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-VH-VL.

En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-enlazador-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH-enlazador-VL-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-enlazador-VL-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VH-VL-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)2 que se une a ENPP3 en el formato de VL-VH-VL-VH.

En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VL-enlazador-VH-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VL-VH-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VL-enlazador-VH-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VL-VH-enlazador-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la

presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-VL-enlazador-VH-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un $sc(Fv)_2$ que se une a ENPP3 en el formato de VL-enlazador-VL-VH-VH. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 descrito en la presente comprende un sc(Fv)2 que se une a ENPP3 en el formato de VL-VL-VH-VH.

En algunas modalidades, los dos dominios VH en un sc(Fv)2 descritos en la presente son iguales. En algunas modalidades, los dos dominios VH en un sc(Fv)2 descritas en la presente son diferentes. En algunas modalidades, los dos dominios VL en un sc(Fv)2 descritos en la presente son iguales. En algunas modalidades, los dos dominios VL en un sc(Fv)2 descritas en la presente son diferentes. En modalidades particulares, los dos dominios VH que forman cualquiera de las estructuras $sc(Fv)_2$ descritas en la presente se seleccionan independientemente de las secuencias de VH descritas en cualquiera de las **Tablas 1 a 11**.

En modalidades particulares, los dos dominios VH que forman cualquiera de las estructuras $sc(Fv)_2$ descritas en la presente se seleccionan independientemente de las sec. con núms. de ident: 22, 45, 68, 91, 113, 134, 158, y 177. En modalidades particulares, los dos dominios VL que forman cualquiera de las estructuras $sc(Fv)_2$ descritas en la presente se seleccionan independientemente de las secuencias de VL descritas en cualquiera de las **Tablas 1 a 11**. En modalidades particulares, los dos dominios VL que forman cualquiera de las estructuras $sc(Fv)_2$ descritas en la presente se seleccionan independientemente de las sec. con núms. de ident: 23, 46, 69, 70, 92, 114, 115, 135, 136, y 178. En modalidades particulares, los dos dominios VH que forman cualquiera de $sc(Fv)_2$ las estructuras descritas en la

presente se seleccionan independientemente de la sec. con núm. de ident.:22, 45, 68, 91, 113, 134, 158, y 177, y los dos dominios VL que forman cualquiera de la $sc(Fv)_2$ las estructuras descritas en la presente se seleccionan independientemente de las sec. con núms. de ident.:23, 46, 69, 70, 92, 114, 115, 135, 136, y 178.

En sistemas de expresión recombinantes, el enlazador es un enlazador peptídico y puede incluir cualquier aminoácido natural. Los aminoácidos ilustrativos que pueden incluirse en el enlazador son Gly, Ser, Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His y The. El enlazador debería tener una longitud que es adecuada para enlazar la VH y la VL de tal manera que formen la conformación correcta con respecto de la otra para retener la actividad deseada, tales como unión a ENPP3.

En algunas modalidades, uno o más enlazadores usados en las estructuras $sc(Fv)_2$ descritas en la presente tienen una longitud de aproximadamente 5-50 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de aproximadamente 10-40 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de aproximadamente 10-35 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de aproximadamente 10-30 aminoácidos. En otras modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-25 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de aproximadamente 10-20 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de aproximadamente 15-20 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de aproximadamente 16-19 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 6 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 7 aminoácidos. En

otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 8 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 9 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 10 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 11 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 12 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 13 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 14 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 15 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 16 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 17 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 18 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 19 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 20 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 21 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 22 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 23 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 24 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 25 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 26 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 27 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 28 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 29 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 30 aminoácidos. En

otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 31 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 32 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 33 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 34 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 35 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 36 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 37 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 38 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 39 aminoácidos. En otras modalidades, el uno o más enlazadores tiene una longitud de 40 aminoácidos. Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse son enlazadores ricos en Gly, enlazadores que contienen Gly y Ser, enlazadores que contienen Gly y Ala, enlazadores que contienen Ala y Ser, y otros enlazadores flexibles.

Otras secuencias del enlazador pueden incluir porciones del área de bisagra de la inmunoglobulina, CL o CH1 derivado de cualquier isotipo de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera. Alternativamente, como enlazadores puede usarse una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Los enlazadores ilustrativos que pueden usarse se muestran en la siguiente tabla. Se describen enlazadores adicionales, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núm. WO2019/060695.

En modalidades específicas, el uno o más enlazadores usados en las estructuras $sc(Fv)_2$ descritas en la presente se seleccionan independientemente de una

cualquiera de las sec. con núms. de ident.:258 a 292. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 258. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 259. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 260. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 261. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 262. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 263. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 264. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 265. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 266. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 267. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 268. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura sc(Fv)$_2$

comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 269. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 270. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 271. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 272. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 273. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 274. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 275. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 276. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 277. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 278. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 279. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 280. En

modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 281. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 282. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 283. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 284. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 285. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 286. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 287. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 288. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 289. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 290. En modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 291. En

modalidades particulares, al menos uno de los enlazadores en la estructura $sc(Fv)_2$ comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 292.

5.4.5 Anticuerpos humanizados

En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente pueden ser anticuerpos humanizados que se unen a ENPP3, que incluyen ENPP3 humana y/o de cynomolgus. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados de la presente descripción pueden comprender una o más CDR como se muestra en las **Tablas 1-11**. Diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humano. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan, frecuentemente, como residuos de "importación", que se toman, típicamente, de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse, por ejemplo, siguiendo el método de Jones *et al.*, 1986, Nature 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-27; y Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239:1534-36), mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable para las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano.

En algunos casos, los anticuerpos humanizados se construyen mediante injerto de CDR, en donde las secuencias de aminoácidos de las seis CDR del anticuerpo no humano parental (p. ej., roedor) se injertan en un marco de anticuerpo humano. Por ejemplo, Padlan *et al.* determinaron que solo aproximadamente un tercio de los residuos en las CDR entran realmente en contacto con el antígeno, y los denominaron "residuos determinantes de especificidad" o SDR, por sus siglas en inglés (Padlan *et al.*, 1995,

FASEB J. 9:133-39). En la técnica de injerto de SDR, solo los residuos SDR se injertan en el marco de anticuerpo humano (ver, p. ej., Kashmiri *et al.*, 2005, Methods 36:25-34).

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usarse en la elaboración de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Por ejemplo, de acuerdo con el denominado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo no humano se analiza contra toda la genoteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor puede seleccionarse como el marco humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, 1993, J. Immunol. 151:2296-308; y Chothia *et al.*, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-17). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89; y Presta *et al.*, 1993, J. Immunol. 151:2623-32). En algunos casos, el marco se deriva de las secuencias consenso de las subclases humanas más abundantes, V_L6 el subgrupo I (V_L6I) y el subgrupo III de V_H (V_HIII). En otro método, los genes de la línea germinal humana se usan como fuente de las regiones marco.

En un paradigma alternativo basado en comparación de las CDR, se llama superhumanización, la homología de FR es irrelevante. El método consiste en comparar la secuencia no humana con el repertorio funcional de genes de la línea germinal humana. Después se seleccionan aquellos genes que codifican las mismas estructuras canónicas o estrechamente relacionadas a las secuencias murinas. A continuación, dentro de los genes que comparten las estructuras canónicas con el

anticuerpo no humano, aquellos con homología más alta dentro de las CDR se eligen como donantes de FR. Por último, las CDR no humanas se injertan en estas FR (ver, p. ej., Tan *et al.*, 2002, J. Immunol. 169:1119-25).

Además, es generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con la retención de su afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se encuentran disponibles comúnmente y resultan familiares para los expertos en la técnica. Los programas de computación que ilustran y muestran las estructuras de conformación tridimensional probables de las secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidato se encuentran disponibles. Estos incluyen, por ejemplo, WAM (Whitelegg y Rees, 2000, Protein Eng. 13:819-24), Modeller (Sali y Blundell, 1993, J. Mol. Biol. 234:779-815) y Swiss PDB Viewer (Guex y Peitsch, 1997, Electrophoresis 18:2714-23). La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de consenso e importación de manera que se alcancen las características deseadas del anticuerpo, tal como, afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana(s). Generalmente, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.

Otro método para la humanización de anticuerpos está basado en una métrica de humanidad del anticuerpo denominado Contenido de cadena humana (HSC, por sus siglas en inglés). Este método compara la secuencia de ratón con el repertorio de genes de la línea germinal humana, y las diferencias se califican como HSC. Después la secuencia diana se humaniza al maximizar su HSC en lugar de usar una medida de identidad global para generar múltiples variantes humanizadas diversas (Lazar *et al.*, 2007, Mol. Immunol. 44:1986-98).

Además de los métodos descritos anteriormente, los métodos empíricos pueden usarse para generar y seleccionar anticuerpos humanizados. Estos métodos incluyen aquellos que se basan en la generación de grandes genotecas de variantes humanizadas y la selección de los mejores clones usando tecnologías de enriquecimiento o técnicas de evaluación de productividad alta. Las variantes de anticuerpo pueden aislarse de las genotecas de exhibición en fagos, ribosomas y levaduras, así como mediante la selección de colonias bacterianas (ver, p. ej., Hoogenboom, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1105-16; Dufner *et al.*, 2006, Trends Biotechnol. 24:523-29; Feldhaus *et al.*, 2003, Nat. Biotechnol. 21:163-70; y Schlapschy *et al.*, 2004, Protein Eng. Des. Sel. 17:847-60).

En el enfoque de la genoteca de FR, se introduce una colección de variantes de residuos en posiciones específicas en la FR seguida de la evaluación de la genoteca para seleccionar la FR que mejor respalda la CDR injertada. Los residuos que se sustituirán pueden incluir algunos o todos los residuos de “Vernier" identificados como potencialmente contribuyentes a la estructura de CDR (ver, p. ej.,

Foote y Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224: 487-99), o del conjunto más limitado de residuos diana identificados por Baca *et al.* 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84).

En el barajado de FR, las FR en su totalidad se combinan con las CDR no humanas en lugar de crear genotecas combinatorias de variantes de residuos seleccionados (ver, p. ej., Dall'Acqua *et al.*, 2005, Methods 36:43-60). Las genotecas pueden revisarse para unirse en un proceso de dos etapas, primero humanizar la VL, seguido por la VH. Alternativamente, puede usarse un proceso de barajado de FR de una etapa. Se ha demostrado que tal proceso es más efectivo que la selección de dos etapas, ya que los anticuerpos resultantes exhibían mejores propiedades bioquímicas y fisicoquímicas, que incluyen una expresión potenciada, una mayor afinidad y estabilidad térmica (ver, p. ej., Damschroder *et al.*, 2007, Mol. Immunol. 44:3049-60).

El método "humanización" se basa en la identificación experimental de determinantes de especificidad mínimos esenciales (MSD) y se basa en el reemplazo secuencial de fragmentos no humanos en genotecas de FR humanas y evaluación de unión. Comienza con las regiones de CDR3 de cadenas VH y VL no humanas y reemplaza progresivamente otras regiones del anticuerpo no humano en los FR humanos, que incluyen la CDR1 y CDR2 de VH y VL. Esta metodología típicamente da como resultado la retención de epítopos e identificación de anticuerpos de subclases múltiples con distintas CDR del segmento V humano. La humanización permite el aislamiento de anticuerpos que son 91-96 % homólogos a los anticuerpos génicos de la línea germinal humana (*ver*, *p. ej.*, Alfenito, Cambridge Healthtech Institute's Third Annual PEGS, The Protein Engineering Summit, 2007).

El método de ‘‘ingeniería humana’’ implica alterar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo no humano, tales como un ratón o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico, al hacer cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para producir un anticuerpo modificado con menor inmunogenicidad en un humano que, no obstante, mantiene las propiedades de unión deseables de los anticuerpos no humanos originales. Generalmente, la técnica implica clasificar los residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano (p. ej., un ratón) como residuos de "riesgo bajo", "riesgo moderado" o "riesgo alto". La clasificación se realiza usando un cálculo global de riesgo/recompensa que evalúa los beneficios esperados de la realización de una sustitución particular (*p. ej.*, para inmunogenicidad en seres humanos) contra el riesgo de que la sustitución afecte el plegado del anticuerpo resultante. El residuo de aminoácido humano particular a sustituirse en una posición dada (*p. ej.,* riesgo bajo o moderado) de una secuencia de anticuerpos no humano puede seleccionarse al alinear una secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo no humano con la región correspondiente de una secuencia de anticuerpo humano específica o de consenso. Los residuos de aminoácidos en posiciones de riesgo bajo o modero en la secuencia no humana pueden sustituirse por los residuos correspondientes en la secuencia del anticuerpo humano de acuerdo con el alineamiento. Las técnicas para elaborar proteínas humanas diseñadas por ingeniería se describen en mayor detalle en Studnicka *et al.*, 1994, Protein Engineering 7:805-14; las patentes de los EE. UU. núms. 5.766.886; 5.770.196; 5.821.123; y 5.869.619; y la publicación PCT núm. WO 93/11794.

5.4.6 Anticuerpos humanos

Los anticuerpos anti-ENPP3 humanos pueden construirse al combinar una secuencia o secuencias de dominio variable del clon de Fv seleccionada(s) de genotecas de exhibición en fagos derivados de seres humanos con una secuencia o secuencias de dominio constante humano conocida(s). Alternativamente, los anticuerpos anti-ENPP3 monoclonales humanos de la presente descripción pueden elaborarse mediante el método de hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, en Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001-05; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (1987); y Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:86-95.

También es posible producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Se han usado ratones transgénicos que expresan repertorios de anticuerpos humanos para generar anticuerpos monoclonales de secuencia humana de alta afinidad contra una amplia variedad de posibles dianas farmacológicas (ver, p. ej., Jakobovits, A., 1995, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66; Brüggemann y Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58; las patentes de los EE. UU. núms. 6.075.181 y 6.150.584; y Lonberg *et al.*, 2005, Nature Biotechnol. 23:1117-25).

Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la inmortalización de células B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (p. ej., tales células B pueden recuperarse de un individuo o pueden

haber sido inmunizados *in vitro*) (ver, p. ej., Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985); Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol. 147(1):86-95; y la patente de los EE. UU. núm. 5.750.373).

El barajado de genes también puede usarse para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedores, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impresión de epítopo" o "selección guiada", cualquiera de la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de exhibición en fagos como se describe en la presente se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humano, al crear una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/humana. La selección con antígeno resulta en el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana, en donde la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido al eliminarse la cadena no humana correspondiente en el clon de exhibición en fago primario (p. ej., el epítopo guía (imprime) la elección del compañero de la cadena humana). Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (ver, p. ej., la patente internacional del PCT núm. WO 93/06213; y Osbourn *et al*., 2005, Methods 36:61-68). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injertos de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano. Los ejemplos de selección guiada para humanizar anticuerpos de ratón hacia antígenos de superficie celular incluyen la proteína de unión a folato presente

en células de cáncer de ovario (ver, p. ej., Figini *et al.*, 1998, Cancer Res. 58:991-96) y CD147, que se expresa altamente en carcinoma hepatocelular (ver, p. ej., Bao *et al.*, 2005, Cancer Biol. Ther. 4:1374-80).

Una posible desventaja del enfoque de selección guiada es que el barajado de una cadena de anticuerpo mientras mantiene la otra constante podría resultar en la desviación del epítopo. Para mantener el epítopo reconocido por el anticuerpo no humano, puede aplicarse la retención de CDR (ver, p. ej., Klimka *et al.*, 2000, Br. J. Cancer. 83:252-60; y Beiboer *et al.*, 2000, J. Mol. Biol. 296:833-49). En este método, la HCDR3 no humana se retiene comúnmente, ya que esta CDR puede estar en el centro del sitio de unión al antígeno y puede ser la región más importante del anticuerpo para el reconocimiento de antígenos. Sin embargo, en algunos casos pueden retenerse HCDR3 y LCDR3, así como HCDR2, LCDR2 y LCDR1 del anticuerpo no humano.

5.4.7 Ingeniería de Fc

En algunas modalidades, los dominios de unión al antígeno que se unen a ENPP3 de la descripción se conjugan con una región constante de la Ig o un fragmento de la región constante de la Ig para impartir propiedades similares a anticuerpos, incluidas funciones efectoras de Fc que se unen a C1q, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión a receptor de Fc, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), fagocitosis o regulación en descenso de los receptores de superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR). En algunas modalidades, los dominios de unión al antígeno que se unen a ENPP3 de la descripción se usan para elaborar una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión comprende los dominios de unión al antígeno que se unen a ENPP3 y una Ig o un fragmento de la región

constante de la Ig para impartir propiedades similares a anticuerpos, incluidas funciones efectoras de Fc que se unen a C1q, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión a receptor de Fc, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis o regulación en descenso de los receptores de superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR). La región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig funciona también como una entidad que prolonga la vida media como se discute en la presente. Los dominios de unión al antígeno que se unen a ENPP3 de la descripción pueden diseñarse por ingeniería en anticuerpos convencionales de longitud completa usando métodos estándar. Los anticuerpos de longitud completa que comprenden el dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 pueden diseñarse por ingeniería adicionalmente como se describe en la presente.

Región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende subdominios CH1, bisagra, CH2 y CH3. El dominio CH1 abarca los residuos A118-V215, los residuos del dominio CH2 A231-K340 y los residuos del dominio CH3 G341-K447 en la cadena pesada, numeración de residuos de acuerdo con el índice de la UE. En algunos casos, G341 se conoce como un residuo del dominio CH2. Bisagra se define generalmente como que incluye E216 y termina en P230 de IgG1 humano. En algunas modalidades, la región Fc de Ig comprende al menos los dominios CH2 y CH3 de la región constante de Ig, y por lo tanto comprende al menos una región de aproximadamente A231 a K447 de la región constante de cadena pesada de Ig.

En algunas modalidades, la lisina del extremo C (CTL) se elimina de la región constante de la Ig. En consecuencia, en algunas modalidades, la región Fc de la Ig comprende al menos una región de aproximadamente A231 a G446 de la región

constante de cadena pesada de la Ig. En modalidades específicas, el CTL es eliminado de la región constante de la Ig por carboxipeptidasas circulantes endógenas en el torrente sanguíneo (Cai *et al.*, (2011) *Biotechnol Bioeng* 108:404-412). En algunas modalidades, durante la Fabricación, la eliminación de CTL puede controlarse a menos del nivel máximo mediante el control de la concentración de Zn^{2+}, EDTA o EDTA - Fe^{3+} extracelular, tal como se describe en la patente de los EE. UU. núm. 20140273092. El contenido de CTL de las proteínas puede medirse por métodos conocidos.

En otras modalidades, el fragmento de unión al antígeno que se une a ENPP3 fusionada con la región constante de la Ig tiene un contenido de lisina extremo C de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 %. En otras modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 %. En otras modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 40 % a aproximadamente 70 %. En otras modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 55 % a aproximadamente 70 %. En otras modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 60 %.

La presente descripción también proporciona un dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 fusionada o conjugada con una región constante de la inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la región constante de la Ig. En algunas modalidades, la región constante de la Ig es una región constante de cadena pesada. En algunas modalidades, la región constante de la Ig es una región constante de cadena ligera. En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende una región Fc. En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende un dominio CH2. En algunas modalidades, el fragmento de la región constante

de la Ig comprende un dominio CH3. En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende el dominio CH2 y el dominio CH3. En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una porción de una bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. Porción de la bisagra se refiere a uno o más residuos de aminoácidos de la bisagra de la Ig. En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende la bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.

En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 se fusiona o se conjuga con el extremo N de la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 se fusiona o se conjuga con el extremo C de la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 se conjuga con la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig a través de un segundo enlazador (L2). En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 258. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 259. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 260. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 261. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 262. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 263. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 264. En modalidades particulares, el L2

comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 265. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 266. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 267. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 268. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 269. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 270. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 271. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 272. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 273. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 274. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 275. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 276. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 277. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 278. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 279. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 280. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 281. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia

de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 282. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 283. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 284. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 285. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 286. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 287. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 288. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 289. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 290. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 291. En modalidades particulares, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 292.

Los dominios de unión al antígeno que se unen a ENPP3 de la descripción fusionados o conjugados con la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig pueden evaluarse para determinar su funcionalidad usando varios ensayos conocidos. La unión a ENPP3 puede evaluarse usando los métodos descritos en la presente. Las propiedades alteradas impartidas por el dominio constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig, tal como la región Fc, pueden analizarse en ensayos de unión al receptor de Fc usando formas solubles de los receptores, tales como FcγRI, FcγRII, FcγRIII o receptores FcRn, o usando ensayos basados en células que miden por ejemplo ADCC, CDC o ADCP.

El ADCC puede evaluarse usando un ensayo *in vitro* usando células que expresan ENPP3 como células diana y células NK como células efectoras. La citólisis puede detectarse por la liberación de la etiqueta (p. ej., sustratos radioactivos, tintes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. En un ensayo ilustrativo, se usan células diana con una relación de 1 célula diana a 4 células efectoras. Las células diana se etiquetan previamente con BATDA y se combinan con células efectoras y el anticuerpo de prueba. Las muestras se incuban durante 2 horas y la lisis celular se mide por la medición de BATDA liberada al sobrenadante. Los datos se normalizan a la citotoxicidad máxima con 0,67 % de Triton X-100 (Sigma Aldrich) y el control mínimo se determina por la liberación espontánea de BATDA de las células diana en ausencia de cualquier anticuerpo.

El ADCP puede evaluarse usando macrófagos derivados de monocitos como células efectoras y cualquier célula que expresa ENPP3 como células diana que se diseñan por ingeniería genética para expresar GFP u otra molécula etiquetada. En un ensayo ilustrativo, la relación célula efectora:diana puede ser, por ejemplo, 4:1. Las células efectoras pueden incubarse con células diana durante 4 horas con o sin el anticuerpo de la invención. Después de la incubación, las células pueden desprenderse usando Accutase. Los macrófagos pueden identificarse con anticuerpos anti-CD11b y anti-CD14 acoplados a un marcador fluorescente, y el porcentaje de fagocitosis puede determinarse basado en el % de fluorescencia GFP en los macrófagos $CD11^{+}CD14^{+}$ usando métodos estándar.

La CDC de células puede medirse, por ejemplo, mediante la siembra en placas de células Daudi a 1×10^{5} células/pocillo (50 µl/pocillo) en RPMI-B (RPMI complementado con BSA al 1 %), la adición de 50 µl de proteína de prueba a los

pocillos a una concentración final entre 0-100 µg/ml, la incubación de la reacción durante 15 min a temperatura ambiente, la adición de 11 µl de mezcla de suero humano agrupado a los pocillos y la incubación de la reacción durante 45 min a 37° C. El porcentaje (%) de células lisadas puede detectarse como el % de células teñidas con yoduro de propidio en el ensayo de FACS usando métodos estándar.

En algunas modalidades, puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-ENPP3 proporcionado en la presente mediante diseño por ingeniería de Fc. En ciertas modalidades, la modificación en la región Fc del anticuerpo resulta en la disminución o eliminación de una función efectora del anticuerpo. En ciertas modalidades, la función efectora es ADCC, ADCP y/o CDC. En algunas modalidades, la función efectora es ADCC. En otras modalidades, la función efectora es ADCP. En otras modalidades, la función efectora es CDC. En una modalidad, la función efectora es ADCC y ADCP. En una modalidad, la función efectora es ADCC y CDC. En una modalidad, la función efectora es ADCP y CDC. En una modalidad, la función efectora es ADCC, ADCP y CDC. Esto puede lograrse al introducir una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, se demostró que las sustituciones en IgG1 humana usando residuos de la IgG2 en las posiciones 233-236 y residuos de la IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reducen en gran medida ADCC y CDC (*ver, p. ej.,* Armour *et al.*, 1999, Eur. J. Immunol. 29(8):2613-24; y Shields *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276(9): 6591-604). Otras variantes de Fc se proporcionan en otra sección de la presente descripción.

Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, puede incorporarse un epítopo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), por ejemplo, como se describe en la patente de los EE. UU.

núm. 5.739.277. El término ‘‘epítopo de unión al receptor de rescate’’ se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una mutación que modula una vida media de un agente unión a ENPP3. En algunas modalidades, la al menos una mutación que modula la vida media del agente unión a ENPP3 se selecciona del grupo que consiste en H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A y H435R, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 comprende una primera región constante de la Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de la Ig o un fragmento de esta. En algunas modalidades, una o ambas de la primera región constante de la Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de la Ig o un fragmento de esta comprenden al menos una mutación que modula una vida media del agente de unión a ENPP3 seleccionado independientemente del grupo que consiste en H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A, y H435R, en donde la numeración de los residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una mutación que resulta en la unión reducida del agente unión a ENPP3 a un FcγR.

En algunas modalidades, al menos una mutación que resulta en la unión reducida del agente de unión a ENPP3 al FcγR se selecciona del grupo que consiste en F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/

P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-eliminado/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S and S228P/F234A/L235A/G236-eliminado/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos se realiza de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 comprende una primera región constante de la Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de la Ig o un fragmento de esta. En algunas modalidades, una o ambas de la primera región constante de Ig o un fragmento de la misma y una segunda región constante de Ig o un fragmento de esta comprende al menos una mutación que modula una vida media del agente de unión a ENPP3 seleccionada independientemente del grupo que consiste en F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-eliminado/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S and S228P/F234A/L235A/G236 eliminado/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, la región constante de la Ig o el fragmento de la región constante de la Ig comprende al menos una mutación que resulta en la unión potenciada del agente unión a ENPP3 a un FcγR.

En algunas modalidades, la al menos una mutación que resulta en la unión potenciada del agente de unión a ENPP3 al FcγR se selecciona del grupo que consiste en S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L y G236A/S239D/I332E, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, el FcγR es FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIII, o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 comprende una primera región constante de la Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de la Ig o un fragmento de esta. En algunas modalidades, una o ambas de la primera región constante de la Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de la Ig o un fragmento de esta comprenden al menos una mutación que modula una vida media del agente de unión a ENPP3 seleccionado independientemente del grupo que consiste en S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L y G236A/S239D/I332E, en donde la numeración de los residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 comprende al menos una mutación en un dominio CH3 de una primera región constante de la Ig o en un dominio CH3 del fragmento de la primera región constante de la Ig y/o al menos una mutación en un dominio CH3 de una segunda región constante de la Ig o en un dominio

CH3 del fragmento de la segunda región constante de la Ig. En algunas modalidades, la al menos una mutación en un dominio CH3 de la primera región constante de la Ig o en un dominio CH3 del fragmento de la primera región constante de la Ig y/o al menos una mutación en un dominio CH3 de la segunda región constante de la Ig o en un dominio CH3 del fragmento de la segunda región constante de la Ig se selecciona del grupo que consiste en T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, T366L, F405W, K392L, T394W, T394S, Y407T, Y407A, H435R, Y436F, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V, T350V/T366L/K392L/T394W, y H435R/L436F, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, al menos una mutación en el dominio CH3 se selecciona del grupo que consiste en H435R, Y436F y H435R/L436F, en donde la numeración de los residuos está de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, la primera región constante de la Ig o el fragmento de la primera región constante de la Ig y la segunda región constante de la Ig o el fragmento de la segunda región constante de la Ig comprenden las siguientes mutaciones L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V en la primera región constante de la Ig y L234A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W en la segunda región constante de la Ig; o L234A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W en la primera región constante de la Ig y L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V en la segunda región constante de la Ig.

5.4.8 Agentes de unión alternativos

La presente descripción abarca agentes de unión que no son de inmunoglobulina que se unen específicamente al mismo epítopo al que lo hace un anticuerpo anti-ENPP3 descrito en la presente. En algunas modalidades, un agente de unión que no es inmunoglobulina se identifica como un agente que desplaza o se desplaza por un anticuerpo anti-ENPP3 de la presente descripción en un ensayo de unión competitivo. Estos agentes aglutinantes alternativos pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los supercóntigos de proteína diseñados por ingeniería conocidos en la técnica. Tales supercóntigos pueden comprender una o más CDR como se muestra en **Tablas 1-11**. Tales supercóntigos incluyen, por ejemplo, anticalinas, que se basan en el supercóntigo de lipocalina, una estructura de proteína caracterizada por un barril beta rígido que soporta cuatro bucles hipervariables que forman el sitio de unión al ligando. Las especificidades de unión novedosas pueden diseñarse por ingeniería mediante mutagénesis aleatoria dirigida en las regiones de bucle, en combinación con la expresión funcional y la selección guiada (ver, p. ej., Skerra, 2008, FEBS J. 275:2677-83). Otros supercóntigos adecuados pueden incluir, por ejemplo, adnectinas, o monocuerpos, basados en el décimo dominio extracelular de fibronectina humana III (ver, *p. ej.*, Koide and Koide, 2007, Methods Mol. Biol. 352: 95-109); aficuerpos, basados en el dominio Z de la proteína estafilocócica A (ver, p. ej., Nygren et al., 2008, FEBS J. 275:2668-76); DARPins, basados en proteínas de repetición de anquirina (ver, *p. ej.*, Stumpp *et al.*, 2008, Drug. Discov. Today 13:695-701); finómeros, basados en el dominio SH3 de la proteína quinasa Fyn humana (ver, *p. ej.*, Grabulovski *et al.*, 2007, J. Biol. Chem. 282:3196-204); afitinas, basadas en

Sac7d de Sulfolobus acidolarius (ver, *p. ej.*, Krehenbrink *et al.*, 2008, J. Mol. Biol. 383:1058-68); afilinas, basadas en y-B-cristalina humana (ver, *p. ej.*, Ebersbach *et al.*, 2007, J. Mol. Biol. 372:172-85); avímeros, basados en el dominio A de proteínas receptoras de membrana (ver, *p. ej.*, Silverman *et al.*, 2005, Biotechnol. 23:1556-61); péptidos de knottina ricos en cisteína (ver, p. ej., Kolmar, 2008, FEBS J. 275:2684-90); e inhibidores de tipo Kunitz diseñados por ingeniería genética (ver, p. ej., Nixon and Wood, 2006, Curr. Opin. Fármaco Discov. Dev. 9:261-68). Para una revisión, ver, por ejemplo, Gebauer y Skerra, 2009, Curr. Opin. Chem. Biol. 13:245-55.

5.5 Proteínas de unión multiespecíficas

En un aspecto de la presente descripción, los agentes de unión a ENPP3 descritos en la presente son multiespecíficos (*p. ej.*, biespecíficas o triespecíficas) moléculas de unión que pueden unirse a uno o más de otros antígenos además de ENPP3.

Los métodos para producir anticuerpos multiespecíficos son conocidos en la técnica, tales como, mediante la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (ver, *p. ej.,* Milstein and Cuello, 1983, Nature 305:537-40). Para obtener más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, ver, por ejemplo, Bispecific Antibodies (Kontermann ed., 2011).

En algunas modalidades, la proteína multiespecífica es biespecífica. En algunas modalidades, la proteína multiespecífica es triespecífica. En algunas modalidades, la proteína multiespecífica es tetraespecífica.

En modalidades específicas, los agentes de unión a ENPP3 descritos en la presente son anticuerpos biespecíficos. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos descritos en la presente son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En ciertas modalidades, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas modalidades, una de las especificidades de unión es para ENPP3 y la otra es para cualquier otro antígeno. En algunas modalidades, una de las especificidades de unión es para ENPP3, y la otra es para otro antígeno de superficie expresado en células que expresan ENPP3. En ciertas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de ENPP3 (*es decir*, bivalente para ENPP3). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (p. ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')2).

En otras modalidades, la proteína multiespecífica es monovalente para unirse a ENPP3. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es bivalente para unirse a ENPP3. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es monovalente para unirse a el segundo antígeno. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es bivalente para unirse al segundo antígeno. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es monovalente para la unión a ENPP3, y es monovalente para la unión al segundo antígeno. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es bivalente para la unión a ENPP3, y es monovalente para la unión al segundo antígeno. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es monovalente para la unión a ENPP3, y es bivalente para la unión al segundo antígeno. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es bivalente para la unión a ENPP3, y es bivalente para la unión al segundo antígeno.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une al segundo antígeno se seleccionan independientemente de una scFv, una $(scFv)_2$, un Fv, un Fab, un $F(ab')_2$, un Fd, un dAb o un VHH. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une con el segundo antígeno comprende el Fab. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une con el segundo antígeno comprende el $F(ab')_2$. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une con el segundo antígeno comprende el VHH. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une con el segundo antígeno comprende el Fv. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une con el segundo antígeno comprende el Fd. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une con el segundo antígeno comprende el scFv. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une con el segundo antígeno comprende el spFv. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 comprende un Fab, y el segundo dominio de unión al antígeno que se une al segundo antígeno comprende el scFv. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 comprende un Fab, y el

segundo dominio de unión al antígeno que se une al segundo antígeno comprende el spFv. En modalidades específicas, el segundo antígeno es CD3ε.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 se fusiona o conjuga con una primera región constante de inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la primera región constante de la Ig y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno tumoral se fusiona conjuga con una segunda región constante de inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la segunda región constante de la Ig.

En algunas modalidades, el fragmento de la primera región constante de Ig y/o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprenden una región de Fc. En algunas modalidades, el fragmento de la primera región constante de Ig y/o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprende un dominio CH2. En algunas modalidades, el fragmento de la primera región constante de Ig y/o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprende un dominio CH3. En algunas modalidades, el fragmento de la primera región constante de Ig y/o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprenden el dominio CH2 y el dominio CH3.

En algunas modalidades, el fragmento de la primera región constante de Ig y/o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprenden al menos porción de una bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. En algunas modalidades, el fragmento de la región constante de la Ig comprende la bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.

En algunas modalidades, la proteína multiespecífica comprende además un segundo enlazador (L2) entre el primer dominio de unión al antígeno que se une a ENPP3 y la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y el segundo dominio de unión al antígeno que se une al segundo

antígeno y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig. En algunas modalidades, el L2 comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las sec. con núm. de ident.:258 a 292.

En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig es un isotipo de IgG1, de IgG2 y de IgG3 o de IgG4. En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig es un isotipo de IgG1. En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig es un isotipo de IgG2. En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig es un isotipo de IgG3. En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig es un isotipo de IgG4.

La primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig también puede diseñarse por ingeniería como se describe en la presente. En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprende al menos una mutación que da como resultado una unión reducida de la proteína multiespecífica con un FcγR.

En algunas modalidades, la al menos una mutación que resulta en la unión reducida de la proteína multiespecífica al FcγR se selecciona del grupo que consiste en F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-deleída/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S y S228P/F234A/L235A/G236-deleída/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprende al menos una mutación que da como resultado una mejor unión de la proteína multiespecífica con un receptor Fcγ (FcγR).

En algunas modalidades, la al menos una mutación que resulta en la unión potenciada de la proteína multiespecífica al FcγR se selecciona del grupo que consiste en S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L y G236A/S239D/I332E, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, el FcγR es FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIII, o cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades, la primera región constante de Ig o el fragmento de la primera región constante de Ig y la segunda región constante de Ig o el fragmento de la segunda región constante de Ig comprende al menos una mutación que modula una vida media de la proteína multiespecífica. En algunas modalidades,

la al menos una mutación que modula la vida media de la proteína multiespecífica se selecciona del grupo que consiste en H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A, y H435R, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, la proteína multiespecífica comprende al menos una mutación en un dominio CH3 de la primera región constante de Ig o en un dominio CH3 del fragmento de la primera región constante de Ig y/o al menos una mutación en un dominio CH3 de la segunda región constante de Ig o en un dominio CH3 del fragmento de la segunda región constante de Ig. En algunas modalidades, la al menos una mutación en un dominio CH3 de la primera región constante de la Ig o en un dominio CH3 del fragmento de la primera región constante de la Ig y/o al menos una mutación en un dominio CH3 de la segunda región constante de la Ig o en un dominio CH3 del fragmento de la segunda región constante de la Ig se selecciona del grupo que consiste en T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, T366L, F405W, K392L, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V y T350V/T366L/K392L/T394W, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, la primera región constante de la Ig o el fragmento de la primera región constante de la Ig y la segunda región constante de la Ig o el fragmento de la segunda región constante de la Ig comprenden las siguientes mutaciones L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V en la primera región

constante de la Ig y L234A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W en la segunda región constante de la Ig; o L234A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W en la primera región constante de la Ig y L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V en la segunda región constante de la Ig.

En algunas modalidades, las proteínas de unión multiespecíficas proporcionadas en la presente son anticuerpos que tienen una estructura de anticuerpo de longitud completa. "Anticuerpo en toda su extensión" se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas del anticuerpo en toda su extensión y dos cadenas ligeras del anticuerpo en toda su extensión. Una cadena pesada del anticuerpo en toda su extensión (HC) consiste en los dominios variable y constante de la cadena pesada VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3 bien conocidos. Una cadena ligera del anticuerpo en toda su extensión (LC) consiste en los dominios variable y constante de la cadena ligera VL y CL bien conocidos. El anticuerpo en toda su extensión puede carecer de la lisina (K) C-terminal ya sea en una o en ambas cadenas pesadas. "Brazo Fab" o "media molécula" se refiere a un par de cadena pesada-cadena ligera que se une específicamente a un antígeno.

Los anticuerpos biespecíficos en toda su extensión pueden generarse, por ejemplo, con el uso del intercambio de brazos Fab (o intercambio de media molécula) entre dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos al introducir sustituciones en la interfase de CH3 de la cadena pesada en cada media molécula para favorecer la formación de heterodímeros de dos medias moléculas de anticuerpos que tienen distinta especificidad, lo mismo en un ambiente libre de células *in vitro* que con el uso de coexpresión. La reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro y la disociación-asociación de dominios CH3. Los enlaces disulfuro de

la cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos monoespecíficos parentales se reducen. Las cisteínas libres resultantes de uno de los anticuerpos monoespecíficos parentales forman un enlace disulfuro entre las cadenas pesadas con restos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y simultáneamente los dominios CH3 de los anticuerpos parentales se liberan y reforman por disociación-asociación. Los dominios CH3 de los brazos Fab pueden modificarse para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab o medias moléculas cada una de las cuales se une a un epítopo distinto, es decir, un epítopo en ENPP3 y un epítopo en CD3.

"Homodimerización" se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas. "Homodímero" se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas. "Heterodimerización" se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas. "Heterodímero" se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen diseños tales como Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), botón en ojal (Genentech), CrossMAbs (Roche) y el emparejado electrostáticamente (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), el LUZ-Y (Genentech), el cuerpo de dominio diseñado de intercambio de hebras (SEEDbody)(EMD Serono), el Biclonic (Merus) y la tecnología DuoBody (Genmab A/S).

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica proporcionada en la presente está en el formato de botón-en-ojal. En algunas modalidades, una proteína de unión multiespecífica proporcionada en la presente está en un formato DuoBody.

La tecnología de quadroma Triomab puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos de longitud completa proporcionados en la presente. La tecnología Triomab promueve el intercambio de brazo Fab entre dos anticuerpos quiméricos parentales, un mAb parental que tiene IgG2a y el segundo mAb parental que tiene regiones constantes de IgG2b de rata, lo que produce anticuerpos biespecíficos quiméricos.

La estrategia de “botón en ojal” (ver, p. ej., la publicación internacional núm. WO 2006/028936) puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos de longitud completa. Brevemente, los aminoácidos seleccionados que forman la interfase de los dominios CH3 en la IgG humana pueden mutarse en las posiciones que afectan las interacciones de los dominios CH3 para promover la formación de heterodímeros. Un aminoácido con una cadena lateral pequeña (ojal) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno y un aminoácido con una cadena lateral grande (botón) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno. Después de la coexpresión de los dos anticuerpos, se forma un heterodímero como un resultado de la interacción preferencial de la cadena pesada con un "ojal" con la cadena pesada con un “botón”. Los pares de sustituciones de CH3 ilustrativas que forman un botón son (expresadas como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena

pesada): T366Y/F405A, T366W/ F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S y T366W/T366S_L368A_Y407V.

La tecnología CrossMAb puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos de longitud completa proporcionados en la presente. CrossMAb, además de usar la estrategia "botón en ojal" para el intercambio del brazo promotor Fab, tienen en uno de los medios brazos los dominios CH1 y CL intercambiados para asegurar el emparejamiento correcto de la cadena ligera del anticuerpo biespecífico resultante (ver, *p. ej.*, la patente de los EE. UU. núm. 8.242.247).

Otras estrategias de cruzamiento pueden usarse para generar anticuerpos biespecíficos de longitud completa proporcionados en la presente al intercambiar dominios variables o constantes, o ambos, entre la cadena pesada y la cadena ligera o dentro de la cadena pesada de los anticuerpos biespecíficos, ya sea en uno o ambos brazos. Estos intercambios incluyen, por ejemplo, VH-CH1 con VL-CL, VH con VL, CH3 con CL y CH3 con CH1 como se describe en las publicaciones internacionales núms. WO 2009/080254, WO 2009/080251, WO 2009/018386 and WO 2009/080252.

Pueden usarse otras estrategias tales como promover la heterodimerización de cadenas pesadas usando interacciones electrostáticas al sustituir residuos cargados positivamente en una superficie de CH3 y residuos cargados negativamente en una segunda superficie de CH3, como se describe en la patente de los EE. UU. internacional núm. US2010/0015133; la publicación de patente internacional núm. US2009/0182127; la publicación de patente internacional núm. US2010/028637; o publicación de internacional núm. US2011/0123532. En otras estrategias, la heterodimerización puede promoverse por las siguientes sustituciones (expresadas como la posición modificada en el primer dominio

CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F, o T350V_L351Y_F405A Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en la publ. internacional núm. US2012/0149876 o publ. de patente internacional núm. US2013/0195849. Otras estrategias que pueden facilitar la eliminación de especies homodiméricas y/o de media molécula incluyen incorporar ambas sustituciones H435R- y Y436F en un dominio CH3 de cadena pesada.

La tecnología LUZ-Y puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos proporcionados en la presente. En esta tecnología, se añade una cremallera de leucina en el terminal C de los dominios CH3 para conducir la unidad de heterodímero de mAb parentales que se elimina después de la purificación como se describe en Wranik *et al.*, (2012) J Biol Chem 287(52): 42221-9.

La tecnología SEEDbody puede usarse para generar anticuerpos biespecíficos proporcionados en la presente. SEEDbodies tienen, en sus dominios constantes, residuos IgG seleccionados sustituidos con residuos IgA para promover la heterodimerización como se describe en la patente de los EE. UU. núm. 20070287170.

Además de los métodos descritos anteriormente, los agentes de unión proporcionados en la presente pueden generarse *in vitro* en un ambiente libre de células al introducir mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos y formar el anticuerpo heterodimérico biespecífico a partir de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos parentales en condiciones

reductoras para permitir la isomerización de enlaces disulfuro de acuerdo con los métodos descritos en la patente PCT. internacional núm. WO 2011/131746.

En algunas modalidades descritas en la presente, el agente de unión a ENPP3 biespecífico descrito en la presente comprende una primera región de unión que se une a ENPP3 y una segunda región de unión que se une a un segundo antígeno, y comprende al menos una sustitución en un dominio constante de anticuerpo CH3. Las sustituciones se hacen, típicamente, a nivel de ADN para una molécula tal como el dominio constante del anticuerpo mediante el uso de métodos estándares.

Los anticuerpos proporcionados en la presente pueden manipularse genéticamente en diversas formas de anticuerpos muy conocidas.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un diacuerpo o un cuerpo cruzado.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico incluye moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios que promueven la heterodimerización; moléculas de direccionamiento doble similares a IgG recombinantes, en donde los dos lados de la molécula contienen, cada uno, el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; moléculas de fusión a IgG, en donde los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan a un fragmento Fab extra o partes del fragmento Fab; moléculas de fusión a Fc, en donde las moléculas Fv de cadena simple o diacuerpos estabilizados se fusionan a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de estas; moléculas de fusión a Fab, en donde diferentes fragmentos de Fab se fusionan juntos; anticuerpos a base de ScFv y diacuerpos, y de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos), en donde diferentes moléculas Fv de cadena sencilla o

diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o a otra proteína o molécula portadora.

En algunas modalidades, las moléculas de direccionamiento doble similares a IgG-recombinante incluyen direccionamiento doble (DT)-Ig (GSK/Domantis), anticuerpo dos en uno (Genentech), Mab reticulados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) y CovX-body (CovX/Pfizer).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión a IgG incluyen dominio variable doble (DVD)-Ig (Abbott), biespecífico similar a IgG (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

En algunas modalidades, las moléculas de fusión a Fc pueden incluir fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), tecnología de redireccionamiento de afinidad doble (Fc-DART) (MacroGenics) y doble$(ScFv)_2$-Fab (National Research Center for Antibody Medicine--China).

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos de fusión a Fab incluyen $F(ab)_2$ (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech). ScFv-, anticuerpos a base de diacuerpo y de dominio, incluyen pero no se limitan a, Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet), Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics), Single-chain Diabody (Academic), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics), Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de doble direccionamiento (Ablynx), anticuerpos de dominio de cadena pesada de doble

direccionamiento. Diversos formatos de anticuerpos biespecíficos se han descrito, por ejemplo, en Chames y Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276 y en Nunez-Prado *et al*., (2015) Drug Discovery Today 20(5):588-594.

5.6 Proteínas de unión a la ENPP3×CD3 biespecíficas

Como se describe en la presente, cualquier antígeno distinto de ENPP3 puede seleccionarse como el segundo objetivo del antígeno para el presente agente de unión ENPP3 multiespecífico. En modalidades específicas, el agente de unión multiespecífico es una proteína de unión multiespecífica. En modalidades particulares, el segundo antígeno se expresa en una célula inmunitaria. En algunas modalidades, el segundo antígeno es CD3. En modalidades específicas, el segundo antígeno es CD3ε.

En modalidades específicas, la proteína de unión multiespecífica descrita en la presente es una proteína de unión a ENPP3xCD3 biespecífico que comprende una primera región de unión al antígeno que se une a ENPP3 y una segunda región de unión al antígeno que se une a CD3ε. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 de proteína de unión multiespecífica puede ser cualquier región de unión a ENPP3 o proteína de unión a ENPP3 descrita en la presente.

En modalidades particulares, la región de unión a CD3ε de la proteína de unión multiespecífica comprende una o más secuencias de unión establecidas en **Tablas 13A a 15**. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende una o más secuencias de CDR establecidas en las sec. con núms. de ident.:159 y 160. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración conocidos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de

Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:200 o 202. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VL comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:201 o 203. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:200 o 202, y una VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:201 o 203. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a CD3ε comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núm. de ident.:179, 185, 187, 189, o 195; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núm. de ident.:180, 186, 188, 190, o 196, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núm. de ident.:181, 191, o 197; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:182, 192, o 198; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núm. de ident.:183, 193, o 199; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núms. de ident.:184 o 194. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε está humanizada. En algunas

modalidades, la región de unión a CD3ε comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a CD3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 13A** o **Tabla 13B**.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.:179, 185, 187, 189, o 195; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.:180, 186, 188, 190, o 196, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de ident.:181, 191, o 197; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de ident.:182, 192, o 198; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de ident.:183, 193, o 199; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184 o 194.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:179, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:180, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:185, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:186, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:187, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:188, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:189, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:190, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:191, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:192, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:193, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:194.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:195, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:196, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:197, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:198, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:179, 180, y 181, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:182, 183, y 184, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:179, 180, y 181, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:182, 183, y 184, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una

HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:185, 186, y 181, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:182, 183, y 184, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:185, 186, y 181, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:182, 183, y 184, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:187, 188, y 181, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:182, 183, y 184, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:187, 188, y 181, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:182, 183, y 184, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:189, 190, y 191, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:192, 193, y 194, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:189, 190, y 191, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:192, 193, y 194, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:195, 196, y 197, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:198, 199, y 184, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:195, 196, y 197, respectivamente, y (ii) una

VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:198, 199, y 184, respectivamente.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende además una o más regiones marco. Las regiones marco descritas en la presente se determinan basadas en los límites del sistema de numeración de CDR. En otras palabras, si las CDR se determinan mediante, p. ej., Kabat, IMGT o Chothia, entonces las regiones marco son los residuos de aminoácidos que rodean las CDR en la región variable en el formato, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Por ejemplo, FR1 se define como los residuos de aminoácidos del extremo N-terminal a los residuos de aminoácido de CDR1 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR2 se define como los residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácido de CDR1 y CDR2 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR3 se define como los residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácidos de CDR2 y CDR3 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; y FR4 se define como los residuos de aminoácidos del extremo C-terminal a los residuos de aminoácidos de CDR3 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende además una o más regiones marco de las sec. con núm. de ident.:200, 201, 202 o 203.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.:200, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:201. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:202, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:203.

En ciertas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende secuencias de aminoácidos con cierto porcentaje de identidad en relación con cualquier región de unión a CD3ε proporcionada en la presente. La determinación del porcentaje de identidad se puede lograr usando algoritmos matemáticos conocidos en la técnica o descritos en este documento.

En algunas modalidades, la región de unión a la CD3ε proporcionada en la presente contiene sustituciones (*p. ej*., sustituciones conservativas), inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero la región de unión a la CD3ε que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a la CD3ε. En algunas modalidades, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de referencia. En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones, o deleciones ocurren en regiones fuera de las CDR (*es decir*, en las FR). Opcionalmente, la región de unión a la CD3ε proporcionada en la presente incluye modificaciones posteriores a la traducción de una secuencia de referencia.

Tabla 13A Secuencias de regiones de unión de CD3B2030-N106A (brazo NPP3B815-CD3)

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT

Región variable de cadena pesada CDR1	RSTMH (sec. con núm. de ident.: 179)	GYTFTRS (sec. con núm. de ident.: 185)	GYTFTRSTMH (sec. con núm. de ident.: 187)	TRSTMH (sec. con núm. de ident.: 189)	GYTFTRST (sec. con núm. de ident.: 195)
Región variable de cadena pesada CDR2	YINPSSAYTNY NQKFQG (sec. con núm. de ident.: 180)	NPSSAY (sec. con núm. de ident.: 186)	YINPSSAYTN (sec. con núm. de ident.: 188)	WIGYINPSSAYTN (sec. con núm. de ident.: 190)	INPSSAYT (sec. con núm. de ident.: 196)
Región variable de cadena pesada CDR3	PQVHYDYAGFP Y (sec. con núm. de ident.: 181)	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 181)	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 181)	ASPQVHYDYAGFP (sec. con núm. de ident.: 191)	ASPQVHYDYA GFPY (sec. con núm. de ident.: 197)
Región variable de cadena ligera CDR1	SASSSVSYMN (sec. con núm. de ident.: 182)	SASSSVSYMN (sec. con núm. de ident.: 182)	SASSSVSYMN (sec. con núm. de ident.: 182)	SYMNWY (sec. con núm. de ident.: 192)	SSVSY (sec. con núm. de ident.: 198)
Región variable de cadena ligera CDR2	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 183)	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 183)	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 183)	RWIYDSSKLA (sec. con núm. de ident.: 193)	DSS)
Región variable de cadena ligera CDR3	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)	QQWSRNPP (sec. con núm. de ident.: 194)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)
VH (sec. con núm. de ident.:200) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGTLVTVSS					
Secuencia de ADN que codifica VH (sec. con núm. de ident.:318) CAGGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCTCCTCCGTGAAAGTGTCCTGCAAGGCTT CCGGCTACACCTTTACCAGATCCACCATGCACTGGGTCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCTTGGAGTGGATCGG CTACATCAACCCCAGCTCCGCCTACACCAACTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACA AGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCT CCTCAGGTTCACTACGACTACGCCGGCTTTCCTTATTGGGGCTGTGGCACCCTGGTCACCGTTTCTTCT					
VL (sec. con núm. de ident.:201) EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDYTLTISSL EPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK					
Secuencia de ADN que codifica VL (sec. con núm. de ident.:319) GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGTGCTTCTCCAGGCGAGAGAGTGACCCTGTCCTGCTCCG CTTCCTCCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCTGCGCCCCTAGAAGATGGATCTACGAC TCCTCCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCTGCTAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCAGAGACTATACCCTGACAAT CTCCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCTAGGAACCCTCCTACCTTTGGCG GAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG					

Tabla 13B Secuencias de la región de unión a CD3B2030-N106A

	Kabat	Chothia	AbM	Contact	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	RSTMH (sec. con núm. de ident.: 179)	GYTFTRS (sec. con núm. de ident.: 185)	GYTFTRSTM H (sec. con núm. de ident.: 187)	TRSTMH (sec. con núm. de ident.: 189)	GYTFTRST (sec. con núm. de ident.: 195)

Región variable de cadena pesada CDR2	YINPSSAYTNYNQKFQG (sec. con núm. de ident.: 180)	NPSSAY (sec. con núm. de ident.: 186)	YINPSSAYTN (sec. con núm. de ident.: 188)	WIGYINPSSAYTN (sec. con núm. de ident.: 190)	INPSSAYT (sec. con núm. de ident.: 196)
Región variable de cadena pesada CDR3	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 181)	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 181)	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 181)	ASPQVHYDYAGFP (sec. con núm. de ident.: 191)	ASPQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 197)
Región variable de cadena ligera CDR1	SASSSVSYMN (sec. con núm. de ident.: 182)	SASSSVSYMN (sec. con núm. de ident.: 182)	SASSSVSYMN (sec. con núm. de ident.: 182)	SYMNWY (sec. con núm. de ident.: 192)	SSVSY (sec. con núm. de ident.: 198)
Región variable de cadena ligera CDR2	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 183)	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 183)	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 183)	RWIYDSSKLA (sec. con núm. de ident.: 193)	DSS)
Región variable de cadena ligera CDR3	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)	QQWSRNPP (sec. con núm. de ident.: 194)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.:184)
VH (sec. con núm. de ident.:202) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGQGTLVTVSS					
VL (sec. con núm. de ident.:203) EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK					

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:220. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:221. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:220, y LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:221. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas

modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a la CD3ε comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:204, 210, o 216; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:205, 211, o 217, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:206, 212, o 218; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:207, 213, o 219; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:208 o 214; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núms. de

ident.:209 o 215. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a CD3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 13C**.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.:204, 210 o 216; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.:205, 211 o 217, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de ident.:206, 212, o 218; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de ident.:207, 213, o 219; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de ident.:208, o 214; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:209 o 215.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:204, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:205, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:206, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:207, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:208, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:209.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:210, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:211, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:212, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:213, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de YAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:215.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:216, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:217, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:218, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:219, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de YAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:209.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:204, 205, y 206, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:207, 208, y 209, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de

aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:204, 205, y 206, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:207, 208, y 209, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:210, 211, y 212, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:213, 214, y 214, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:210, 211, y 212, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:213, 214, y 214, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:216, 217, y 218, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:219, 214, y 209, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que

comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:216, 217, y 218, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:219, 214, y 209, respectivamente.

Tabla 13C Secuencias de la región de unión a CD3W245

	Kabat	Chothia	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	RYNMN (sec. con núm. de ident.: 204)	GFTFSRY (sec. con núm. de ident.: 210)	GFTFSRYN (sec. con núm. de ident.: 216)
Región variable de cadena pesada CDR2	SISTSSNYIYYADSVKG (sec. con núm. de ident.: 205)	STSSNY (sec. con núm. de ident.: 211)	ISTSSNYI (sec. con núm. de ident.: 217)
Región variable de cadena pesada CDR3	GWGPFDY (sec. con núm. de ident.:206)	GWGPFD (sec. con núm. de ident.: 212)	TRGWGPFDY (sec. con núm. de ident.: 218)
Región variable de cadena ligera CDR1	RARQSIGTAIH (sec. con núm. de ident.:207)	RQSIGTA (sec. con núm. de ident.: 213)	QSIGTA (sec. con núm. de ident.: 219)
Región variable de cadena ligera CDR2	YASESIS (sec. con núm. de ident.: 208)	YAS	YAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQSGSWPYT (sec. con núm. de ident.:209)	SGSWPY (sec. con núm. de ident.: 215)	QQSGSWPYT (sec. con núm. de ident.:209)
VH (sec. con núm. de ident.:220) EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS			
VL (sec. con núm. de ident.:221) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK			

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:228. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:229. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada

en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:228, y LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:229. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a la CD3ε comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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.:222; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:223, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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.:224; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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.:225; (v) una LCDR2 que comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene 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.:226; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:227. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a CD3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 13D**.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:222, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:223, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:224, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:225, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:226, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:227.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:222, 223, y 225, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una

región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:225, 226, y 227, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:222, 223, y 225, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:225, 226, y 227, respectivamente.

Tabla 13D Secuencias de la región de unión a CD3B450

	Kabat
Región variable de cadena pesada CDR1	NNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 222)
Región variable de cadena pesada CDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (sec. con núm. de ident.: 223)
Región variable de cadena pesada CDR3	GYSSSFDY (sec. con núm. de ident.: 224)
Región variable de cadena ligera CDR1	TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 225)
Región variable de cadena ligera CDR2	EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 226)
Región variable de cadena ligera CDR3	VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 227)
VH (sec. con núm. de ident.:228) QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGYSSSFDYWGQGTLVTVSS	
VL (sec. con núm. de ident.:229) QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPGKAPKVMIYEVSKRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con

núm. de ident.:246. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:247. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:246, y LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:247. Las secuencias de CDR pueden determinarse de acuerdo con sistemas de numeración muy conocidos o una combinación de estos. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de IMGT. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de AbM. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Chothia. En otras modalidades, las CDR están de acuerdo con la numeración de Contact.

En otras modalidades, la región de unión a la CD3ε comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:230, 236, y 242; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núms. de ident.:231, 237, y 243, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:232, 238, y 244;

(iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:233, 239, y 245; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 cualquiera de las sec. con núms. de ident.:234 y 240; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núms. de ident.:235 o 241. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a CD3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 13E**.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:230, 236, y 242; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:231, 237 y 243, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:232, 238, y 244; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:233, 239, y 245; (v) una LCDR2 que comprende una

secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:234, y 240; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:235 o 241.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:230, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:231, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:232, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:233, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:234, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:235.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:236, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:237, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:238, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:239, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:241.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:242, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:243, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:244, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.:245, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:235.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:230, 231, y 232, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:233, 234, y 235, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:230, 231, y 232, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:233, 234, y 235, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:236, 237, y 238, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:239, 240, y 241, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de

aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:236, 237, y 238, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:239, 240, y 241, respectivamente.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:242, 243, y 244, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:245, 240, y 235, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:242, 243, y 244, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:245, 240, y 235, respectivamente.

Tabla 13E Secuencias de la región de unión a CD3B2051-N106A

	Kabat	Chothia	IMGT
Región variable de cadena pesada CDR1	RSTMH (sec. con núm. de ident.: 230)	GYTFTRS (sec. con núm. de ident.: 236)	GYTFTRST (sec. con núm. de ident.: 242)
Región variable de cadena pesada CDR2	YINPSSAYTNYNQKFQG (sec. con núm. de ident.: 231)	NPSSAY (sec. con núm. de ident.: 237)	INPSSAYT (sec. con núm. de ident.: 243)
Región variable de cadena pesada CDR3	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 232)	PQVHYDYAGFP (sec. con núm. de ident.: 238)	ASPQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 244)
Región variable de cadena ligera CDR1	SASSSVSYMN (sec. con núm. de ident.: 233)	SSSVSY (sec. con núm. de ident.:239)	SSVSY (sec. con núm. de ident.: 245)

Región variable de cadena ligera CDR2	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 234)	DSS	DSS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.: 235)	WSRNPP (sec. con núm. de ident.: 241)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.: 235)
VH (sec. con núm. de ident.:246) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGLEWMGYINPSSAYTNYNQKFQGRV TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGQGTLVTVSS			
VL (sec. con núm. de ident.:247) EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRRLIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDY TLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK			

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:312. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:313. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:312, y LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se establece en la sec. con núm. de ident.:313.

En otras modalidades, la región de unión a la CD3ε comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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.:306; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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 las sec. con núm. de ident.:307, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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.:308; (v) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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.:309; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 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.:310; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:311. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε está humanizada. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a CD3 proporcionada en la presente comprende una o más CDR en la **Tabla 13F**.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprenden una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:306; (ii) una HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:307, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:308; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:309; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:310; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:311.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:306, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:307, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:308, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:309, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:310, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:311.

En una modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:306, 307, y 308, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:309, 310, y 311, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3ε, que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:306, 307, y 308, respectivamente, y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:309, 310, y 311, respectivamente.

Tabla 13F Secuencias de la región de unión a CD3B376

Región variable de cadena pesada CDR1	NNNAAWS (sec. con núm. de ident.: 306)
Región variable de cadena pesada CDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (sec. con núm. de ident.: 307)
Región variable de cadena pesada CDR3	GYSSSFDY (sec. con núm. de ident.: 308)
Región variable de cadena ligera CDR1	TGTSSNIGTYKFVS (sec. con núm. de ident.: 309)
Región variable de cadena ligera CDR2	EVSKRPS (sec. con núm. de ident.: 310)
Región variable de cadena ligera CDR3	VSYAGSGTLL (sec. con núm. de ident.: 311)
VH (sec. con núm. de ident.:312) QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKS RITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDYWGQGTLVTVSS	
VL (sec. con núm. de ident.:313) QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	
(sec. con núm. de ident.:314) QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKS RITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
(sec. con núm. de ident.:315) QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS	

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende además una o más regiones marco. Las regiones marco descritas en la presente se determinan basadas en los límites del sistema de numeración de CDR. En otras palabras, si las CDR se determinan mediante, p. ej., Kabat, IMGT o Chothia, entonces las regiones marco son los residuos de aminoácidos que rodean las CDR en la región variable en el formato, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-

FR3-CDR3-FR4. Por ejemplo, FR1 se define como los residuos de aminoácidos del extremo N-terminal a los residuos de aminoácido de CDR1 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR2 se define como los residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácido de CDR1 y CDR2 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; FR3 se define como los residuos de aminoácidos entre los residuos de aminoácidos de CDR2 y CDR3 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia; y FR4 se define como los residuos de aminoácidos del extremo C-terminal a los residuos de aminoácidos de CDR3 tal como lo define, p. ej., el sistema de numeración de Kabat, el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia. En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε comprende además una o más regiones marco de las sec. con núms. de ident.:220, 221, 228, 229, 246 o 247.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:220, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:221.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:228, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:229.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:246, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:247.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:312, y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:313.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente comprende un dominio VH que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:200, 202, 220, 228, 246 o 312, y un dominio VL que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:201, 203, 221, 229, 247 o 313.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a CD3ε que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:201, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:202.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a CD3ε que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:203, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:204.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a CD3ε que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:220, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:221.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a CD3ε que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:228, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:229.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a CD3ε que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:246, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:247.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3ε proporcionada en la presente se une al mismo epítopo que una región de unión a CD3ε que comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:312, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:313.

En modalidades específicas, la región de unión a CD3ε es un scFv. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una o más sustituciones de aminoácidos, tales como aquellas scFv estabilizantes.

En algunas modalidades específicas, la región de unión a CD3ε es un spFv. En algunas modalidades, el spFv de unión a CD3ε comprende un enlazador que comprende al menos un residuo Cys que sirve como punto de anclaje para formar un enlace disulfuro entre la VH y el enlazador. En algunas modalidades, el spFv de unión a CD3ε comprende un enlazador que comprende al menos un residuo Cys que sirve como punto de anclaje para formar un enlace disulfuro entre la VL y el enlazador. En algunas modalidades, el spFv de unión a CD3ε comprende un enlazador que comprende al menos dos residuos Cys que sirven como puntos de anclaje para formar enlaces disulfuro entre la VH y el enlazador y la VL y el enlazador.

En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende las secuencias de VH y VL descritas en cualquiera de las **Tablas 13B** a **13F**. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una VH que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:202, 220, 228, 246 o 312. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una VL que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:203, 221, 229, 247 o 313. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una VH que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:202 y una VL que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:203. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una VH que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:220 y una VL que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:221. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una VH que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:228 y una VL que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:229. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una VH que comprende la

secuencia de la sec. con núm. de ident.:246 y una VL que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:247. En algunas modalidades, el scFv de unión a CD3ε comprende una VH que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:312 y una VL que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:313.

En algunas modalidades, el spFv de unión a CD3ε comprende una VH que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:200 y una VL que comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.:201.

En modalidades específicas, cualquiera de los dominios de VH y VL descritos en la presente que se unen a CD3ε se pueden diseñar por ingeniería en formato scFv o spFv en orientación VH-enlazador-VL o VL-enlazador-VH. Alternativamente, los dominios VH y VL pueden diseñarse por ingeniería genética en el formato scFv sin el uso de un enlazador en la orientación VH-VL o VL-VH.

En modalidades específicas, el scFv o spFv de unión a CD3ε comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:200 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:201. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:200 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:201 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:200 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:201 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:200 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:201 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:200 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:201 están enlazadas con un enlazador en el scFv o spFv. En algunas modalidades,

la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:200 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:201 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv o spFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:201 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:200 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv o spFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:258-292. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el spFv comprende al menos un residuo Cys que sirve como punto de anclaje para formar un enlace disulfuro entre la VH y el enlazador. En algunas modalidades, el enlazador que conecta la VH y VL en el spFv comprende al menos un residuo Cys que sirve como punto de anclaje para formar un enlace disulfuro entre el VL y el enlazador. En algunas modalidades, el enlazador que conecta la VH y VL en el spFv comprende un primer residuo de Cys que sirve como punto de anclaje para formar un enlace disulfuro entre el VH y el enlazador y un segundo residuo Cys que sirve como punto de anclaje para formar un enlace disulfuro entre la VL y el enlazador. En una modalidad, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:292.

En modalidades específicas, el scFv de unión a CD3ε comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:203 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:204. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:203 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:204 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:203 se fusiona al extremo N de la VL que

comprende la sec. con núm. de ident.:204 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:203 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:204 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:203 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:204 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:203 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:204 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:203 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:204 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En modalidades específicas, el scFv de unión a CD3ε comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:220 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:221. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:220 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:221 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:220 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:221 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:220 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:221 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:220 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:221 se unen con un enlazador en el scFv. En

algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:220 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:221 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:220 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:221 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En modalidades específicas, el scFv de unión a CD3ε comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:228 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:229. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:228 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:229 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:228 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:229 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:228 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:229 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:228 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:229 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:228 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:229 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:228 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:229 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades

descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En modalidades específicas, el scFv de unión a CD3ε comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:246 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:247. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:246 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:247 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:246 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:247 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:246 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:247 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:246 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:247 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:246 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:247 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:246 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:247 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En modalidades específicas, el scFv de unión a CD3ε comprende la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:312 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:313. En modalidades particulares, la VH que comprende la sec. con núm. de

ident.:312 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:313 se fusionan directamente entre sí sin un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:312 se fusiona al extremo N de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:313 en la orientación VH-VL. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:312 se fusiona al extremo C de la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:313 en la orientación VL-VH. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:312 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:313 se unen con un enlazador en el scFv. En algunas modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:312 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:313 y el enlazador se fusionan en la orientación VH-enlazador-VL en el scFv. En otras modalidades, la VH que comprende la sec. con núm. de ident.:312 y la VL que comprende la sec. con núm. de ident.:313 y el enlazador se fusionan en la orientación VL-enlazador-VH en el scFv. En algunas modalidades descritas en el presente párrafo, el enlazador que conecta la VH y VL en el scFv comprende una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.:258-292.

En algunas modalidades, el scFv o spFv de unión a CD3ε está en la orientación VL-enlazador-VH. En algunas modalidades, el scFv o spFv comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:248. En algunas modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:250. En algunas modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:252. En algunas modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:254.

En modalidades particulares, el scFv o spFv de unión a CD3ε está en la orientación VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:249. En algunas modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:251. En algunas modalidades, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:253.

Tabla 14. spFv de unión a CD3ε

Nombre de dominio de unión	Secuencia de aminoácidos de spFv-LH
scFv de CD3B2030-N106A	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASGV PARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGS GGCPPCGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQ GLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQ VHYDYAGFPYWGCGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.:248)

Tabla 15. scFvs de unión a CD3ε

Nombre de dominio de unión	Secuencia de aminoácidos de scFv-HL	Secuencia de aminoácidos de scFv-LH
CD3B2030-N106A	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTRSTMHWVKQAPGQGLEWIG YINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQ VHYDYAGFPYWGQGTLVTVSSGGS EGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSP ATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMN WYQQKPGQAPRRWIYDSSKLASGV PARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK (sec. con núm. de ident.: 249)	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVS YMNWYQQKPGQAPRRWIYDSSKLASGVP ARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQ QWSRNPPTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGS GSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGLE WIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDY AGFPYWGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 250)
CD3W245	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVS SISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGW GPFDYWGQGTLVTVSSGGSEGKSS GSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS GSWPYTFGQGTKLEIK (sec. con núm. de ident.: 251)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIG TAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWV SSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNS LDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYW GQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 252)
CD3B2051-N106A	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTRSTMHWVKQAPGQGLEWM GYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTAD	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVS YMNWYQQKPGQAPRRLIYDSSKLASGVP ARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQ

	KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASP QVHYDYAGFPYWGQGTLVTVSSGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQS PATLSASPGERVTLSCSASSSVSYM NWYQQKPGQAPRRLIYDSSKLASGV PARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK (sec. con núm. de ident.: 253)	QWSRNPPTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGS GSESKSTGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGLE WMGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYD YAGFPYWGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 254)

En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente tiene la estructura como se ilustra en la **Figura 20**. En modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende un scFv que se une a CD3ε y un Fab que se une a ENPP3, y la proteína de unión comprende además una región Fc. En modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε que se enlaza a un brazo de una región Fc de anticuerpo, (ii) un segundo polipéptido que comprende el dominio VH que se une a la ENPP3 que se enlaza al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iii) un tercer polipéptido que comprende el dominio VL que se une a la ENPP3, en donde el dominio VH y el dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a ENPP3 que se enlaza a un brazo de una región Fc de anticuerpo, (ii) un segundo polipéptido que comprende el dominio VH que se une a la CD3ε que se enlaza al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iii) un tercer polipéptido que comprende el dominio VL que se une a la CD3ε, en donde el dominio

VH y el dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc.

En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende una o más mutaciones de región constante.

En algunas modalidades, las regiones Fc comprenden una o más modificaciones que facilitan la heterodimerización del primer y segundo polipéptidos. En algunas modalidades, un brazo de la región Fc comprende sustitución T366W y el otro brazo de la región Fc comprende las sustituciones T366S, L368A, Y407V. En algunas modalidades, la región Fc comprende una o más mutaciones que reducen la afinidad de unión del dominio Fc a los receptores Fc. En modalidades particulares, un brazo de la región Fc comprende mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS). En modalidades particulares, el segundo brazo de la región Fc comprende mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS). En modalidades particulares, cada primer y segundo brazos de la región Fc comprenden mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS).

En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε que se enlaza a un brazo de una región Fc de anticuerpo, (ii) un segundo polipéptido que comprende el dominio VH que se une a la ENPP3 que se enlaza al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iii) un tercer polipéptido que comprende el dominio VL que se une a la ENPP3, en donde el dominio VH y el dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc. además en donde la región Fc del primer polipéptido comprende las sustituciones T366S, L368A, Y407V, y la región Fc del segundo polipéptido comprende la

sustitución T366W. En modalidades específicas descritas en este párrafo, la región Fc del primer polipéptido comprende además las mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS). En modalidades específicas descritas en este párrafo, la región Fc del segundo polipéptido comprende además las mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS). En modalidades específicas descritas en este párrafo, ambas regiones Fc del primer y segundo polipéptidos comprenden además las mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS).

En modalidades alternativas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε que se enlaza a un brazo de una región Fc de anticuerpo, (ii) un segundo polipéptido que comprende el dominio VH que se une a la ENPP3 que se enlaza al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iii) un tercer polipéptido que comprende el dominio VL que se une a la ENPP3, en donde el dominio VH y el dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc. además en donde la región Fc del primer polipéptido comprende la sustitución T366W y la región Fc del segundo polipéptido comprende las sustituciones T366S, L368A, Y407V. En modalidades específicas descritas en este párrafo, la región Fc del primer polipéptido comprende además las mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS). En modalidades específicas descritas en este párrafo, la región Fc del segundo polipéptido comprende además las mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS). En modalidades específicas descritas en este párrafo, ambas regiones Fc del primer y segundo polipéptidos comprenden además las mutaciones L234A, L235A, y D265S (AAS).

En modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un

scFv o spFv que se une a CD3ε que se enlaza a un brazo de una región Fc de anticuerpo, (ii) un segundo polipéptido que comprende el dominio VH que se une a la ENPP3 que se enlaza al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iii) un tercer polipéptido que comprende el dominio VL que se une a la ENPP3, en donde el dominio VH y el dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc. En algunas modalidades, el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:255. En algunas modalidades, el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:256. En algunas modalidades, el tercer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:257.

En una modalidad específica, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε que se enlaza a un brazo de una región Fc de anticuerpo, (ii) un segundo polipéptido que comprende el dominio VH que se une a ENPP3 que se enlaza al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iii) un tercer polipéptido que comprende el dominio VL que se une a ENPP3, en donde el dominio VH y el dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:255, el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:256 y el tercer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:257 (ver la **Tabla 16A**). En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente está codificada por secuencias de ácido nucleico que se muestran en **la Tabla 16B** . En

algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente está codificada por secuencias de ácido nucleico que se muestran en **la Tabla 16C**.

Tabla 16A Secuencias de NPP3B815

	Aminoácidos
Cadena pesada 1 (1° polipéptido)	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASG VPARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSG GSGGCPPCGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQA PGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ASPQVHYDYAGFPYWGCGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.:255)
Cadena pesada 2 (2° polipéptido)	EVQLVESGGGRVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSIS SYVKYADSVKGRFTMSRDNAKNSLFLQMNSLRDEDMAVYYCARGHYFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.:256)
Cadena ligera (3er polipéptido)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGLAPRLLIYGASTRAT GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.:257)

Tabla 16B Secuencias de ADN que codifican NPP3B815

	Polinucleótido
Cadena pesada 1 (1er polinucleótido)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGTGCTTCTCCAGGCGAGAG AGTGACCCTGTCCTGCTCCGCTTCCTCCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCTGCGCCCCTAGAAGATGGATCTACGACTCCTCCAAGCTGG CCTCTGGCGTGCCTGCTAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCAGAGACTATACCC TGACAATCTCCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGT GGTCTAGGAACCCTCCTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGGC GGAGGTTCTGGTGGATCTGGCGGATGTCCTCCTTGTGGTGGAAGCGGCGGACA GGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCTCCTCCGTGA AAGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTACCAGATCCACCATGCACTGGG TCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCTTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCCAGC TCCGCCTACACCAACTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCC GACAAGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCTCCTCAGGTTCACTACGACTACGCCGGCTTT CCTTATTGGGGCTGTGGCACCCTGGTCACCGTTTCTTCTGAGCCCAAATCTAGC GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG

	CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCGAACAAAG CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA (sec. con núm. de ident.:320)
Cadena pesada 2 (2° polinucleótido)	GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGAAGAGTGAAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCTCCGACTACTCCATGAACTG GGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCTCTATCTCCTCCAT CTCCAGCTACGTGAAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATGTCCA GAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTTCCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGACGAG GACATGGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCCACTACTTCGACTACTGGGGACAG GGCACACTGGTCACAGTCTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCC GCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TGTCGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCGGTTCACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAA AA (sec. con núm. de ident.: 321)
Cadena ligera (3er polinucleótido)	GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGAG AGCTACCCTGTCTTGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCCTCCAACCTGGCCTGGTA TCAGCAGAAGCCTGGACTGGCTCCCCGGCTGTTGATCTATGGCGCTTCTACCAG AGCCACAGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGAGTTTAC CCTGACCATCTCCAGCCTGCAGTCCGAGGATTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCA GTACAACAACTGGCCCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGC GTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (sec. con núm. de ident.: 322)

Tabla 16C Secuencias de ADN con codones optimizados que codifican NPP3B815

	Secuencia del polinucleótido
Cadena pesada 1 (1er polinucleótido)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGTGCTTCTCCAGGCGAGAG AGTGACCCTGTCCTGCTCCGCTTCCTCCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCTGCGCCCCTAGAAGATGGATCTACGACTCCTCCAAGCTGG CCTCTGGCGTGCCTGCTAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCAGAGACTATACCC

	TGACAATCTCCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGT GGTCTAGGAACCCTCCTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGGC GGAGGTTCTGGTGGATCTGGCGGATGTCCTCCTTGTGGTGGAAGCGGCGGACA GGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCTCCTCCGTGA AAGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTACCAGATCCACCATGCACTGGG TCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCTTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCCAGC TCCGCCTACACCAACTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCC GACAAGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCTCCTCAGGTTCACTACGACTACGCCGGCTTT CCTTATTGGGGCTGTGGCACCCTGGTCACCGTTTCTTCTGAGCCCAAATCTAGC GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCGAACAAAG CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAATGA (sec. con núm. de ident.:324)
Cadena pesada 2 (2° polinucleótido)	GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGAAGAGTGAAGCCTGGCGGATCTCT GAGACTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCTCCGACTACTCCATGAACTG GGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCTCTATCTCCTCCAT CTCCAGCTACGTGAAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATGTCCA GAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTTCCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGACGAG GACATGGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCCACTACTTCGACTACTGGGGACAG GGCACACTGGTCACAGTCTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCC GCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TGTCGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCGGTTCACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAA ATGA (sec. con núm. de ident.:325)
Cadena ligera (3er polinucleótido)	GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGAGA GCTACCCTGTCTTGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCCTCCAACCTGGCCTGGTAT CAGCAGAAGCCTGGACTGGCTCCCCGGCTGTTGATCTATGGCGCTTCTACCAGA GCCACAGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGAGTTTACC CTGACCATCTCCAGCCTGCAGTCCGAGGATTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAG TACAACAACTGGCCCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCG TACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC

	CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTG A (sec. con núm. de ident.: 326)

En modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε, en donde el scFv o spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε, en donde el scFv o spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el

segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a ENPP3, en donde el scFv o spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a CD3ε en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la CD3ε, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la CD3ε; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε, en donde el scFv o spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a CD3ε en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la CD3ε,

en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la CD3ε; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a ENPP3, en donde el scFv o spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a ENPP3, en donde el scFv o spFv se enlaza con un primer

dominio VH (o primera VL) que se une a CD3ε en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la CD3ε, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la CD3ε; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε, en donde el scFv o spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada está en el formato Central-scFv como se describe en la Patente de los EE. UU. núm. 10.889.653, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades , la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada está en el formato spFv como se describe en la Publicación de solicitud de patente internacional núm. WO2021030657, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a la CD3ε, en donde el spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a la CD3ε, en donde el spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc

de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a la ENPP3, en donde el spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a CD3ε en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la CD3ε, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la CD3ε; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un

spFv que se une a la CD3ε, en donde el spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a CD3ε en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la CD3ε, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la CD3ε; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a la ENPP3, en donde el spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a la ENPP3, en donde el spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a CD3ε en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la CD3ε, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la CD3ε; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a CD3ε, en donde el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a CD3ε, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades específicas, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a la CD3ε, en donde el spFv se enlaza con un primer dominio VH (o primera VL) que se une a ENPP3 en un extremo, y se enlaza además a un brazo de una región Fc de anticuerpo en el otro extremo; (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio de VL (o primer dominio VH) que se une a la ENPP3, en donde la primera VH (o primera VL) y los primeros dominios VL (o primeros dominios VH) forman un Fab que se une a la ENPP3; (iii) un tercer polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a ENPP3, en donde el segundo dominio VH se une al otro brazo de una región Fc de anticuerpo, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende el segundo dominio VL que se une a ENPP3, en donde el

segundo dominio VH y el segundo dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y en donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido forman una región Fc.

En algunas modalidades, la región Fc comprende una o más mutaciones de aminoácidos que facilitan la dimerización de los dos brazos de la región Fc. En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv que se une a CD3ε, un CH2 y un CH3, (ii) un segundo polipéptido que comprende el dominio VH que se une a ENPP3, un CH2 y un CH3, y (iii) un tercer polipéptido que comprende el dominio VL que se une a ENPP3, en donde el dominio VH y el dominio VL forman un Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc.

En otras modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende un scFv que se une a CD3 y dos Fab cada uno se une a ENPP3, y el agente de unión comprende además una región Fc. En algunas modalidades, los dos Fab son idénticos y están unidos entre sí.

En otras modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende un spFv que se une a CD3 y dos Fab cada uno se une a ENPP3, y el agente de unión comprende además una región Fc. En algunas modalidades, los dos Fab son idénticos y están unidos entre sí.

En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε que se enlaza a un brazo de una región Fc de anticuerpo, (ii) un segundo polipéptido que comprende dos dominios VH idénticos en tándem se une cada uno a ENPP3 que está unida al otro brazo de una región Fc de

anticuerpo, (iii) un tercer polipéptido que comprende un dominio VL que se une a ENPP3, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende un dominio VL que se une a ENPP3, en donde los dos dominios VH y los dos dominios VL forman dos Fab que se unen a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc. En algunas modalidades, la región Fc comprende una o más mutaciones de aminoácidos que facilitan la dimerización de los dos brazos de la región Fc.

En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un scFv o spFv que se une a CD3ε, un CH2 y un CH3, (ii) un segundo polipéptido que comprende un primer dominio VH que se une a ENPP3, un segundo dominio VH que se une a ENPP3, un CH2 y un CH3, (iii) un tercer polipéptido que comprende un primer dominio VL que se une a ENPP3, y (iv) un cuarto polipéptido que comprende un segundo dominio VH que se une a ENPP3, en donde el primer dominio VH y el primer dominio VL forman un primer Fab que se une a ENPP3, el segundo dominio VH y el segundo dominio VL forma una segunda Fab que se une a ENPP3, y el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman una región Fc.

5.7 Polinucleótidos, vectores, y células huésped

También se describen polinucleótidos aislados que codifican la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente. Los polinucleótidos aislados capaces de codificar la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente pueden incluir los mismos, o diferentes, vectores para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención.

En algunas modalidades, los polinucleótidos de la invención incluyen un polinucleótido que codifica una secuencia líder. Puede usarse cualquier secuencia líder conocida en la técnica. El polinucleótido que codifica la secuencia líder puede incluir un sitio de escisión de endonucleasa de restricción o un sitio de iniciación de la traducción.

También se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención. Los vectores pueden ser vectores de expresión. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, pero sin limitarse a, secuencias reguladoras (p. ej., promotoras, potenciadoras), un marcador de selección y una señal de poliadenilación.

Los vectores de expresión recombinantes dentro del alcance de la descripción incluyen fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, o derivados de ADNc que codifican al menos una proteína recombinante que puede unirse operativamente a elementos regulatorios adecuados.

Las secuencias control transcripcionales y traduccionales en los vectores de expresión para usarlas en las células de vertebrados transformantes pueden proporcionarse por fuentes virales. Los vectores ilustrativos pueden construirse como se describe por Okayama y Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

En algunas modalidades, la secuencia codificante del fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno se coloca bajo el control de un potente promotor constitutivo. En adición, muchos promotores virales funcionan de forma constitutiva en células eucarióticas y son adecuados para el uso con las modalidades descritas. En una modalidad, la secuencia codificante del anticuerpo biespecífico de la invención o un fragmento de unión al antígeno de este se coloca bajo el control de un promotor inducible.

Los vectores descritos en la presente pueden contener uno o más sitios de entrada al ribosoma internos (IRES). La inclusión de una secuencia IRES en los vectores de expresión puede ser beneficioso para potenciar la expresión de algunas proteínas. En algunas modalidades, el sistema de vectores incluirá uno o más sitios de poliadenilación, que puede estar corriente arriba o corriente abajo de cualquier secuencia de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente.

Los vectores pueden comprender marcadores de selección. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación puede estar corriente arriba o corriente abajo de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés o sitio de clonación.

Los vectores descritos en la presente pueden usarse para transformar varias células con los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Por ejemplo, pueden usarse vectores para generar anticuerpos ENPP3xCD3 biespecíficos o células productoras de fragmentos de unión al antígeno. Por lo tanto, la invención también proporciona una célula huésped que comprende los vectores de la invención.

Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células y pueden usarse para construir las células recombinantes para propósitos de llevar a cabo los métodos descritos, de acuerdo con las varias modalidades descritas y ejemplificadas en la presente. La técnica usada proporcionaría la transferencia estable de la secuencia de genes heterólogos a la célula huésped, tal que la secuencia de genes heterólogos sea heredable y expresable por la progenie celular, y de manera que no se afecten las funciones de

desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. Las técnicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, la transferencia de cromosomas (p. ej., fusión de células, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por micro células), métodos físicos (p. ej., transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, portador de liposomas), transferencia de vectores virales (p. ej., virus de ADN recombinante, virus de ARN recombinante) y lo similar (descritas en Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)). La precipitación con fosfato de calcio y la fusión inducida por polietilenglicol (PEG) de protoplastos bacterianos con células de mamíferos pueden usarse para transformar células.

Las células adecuadas para su uso en la expresión de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente son preferentemente células eucariotas, con mayor preferencia células de origen vegetal, de roedor o humano. En adición, la expresión de anticuerpos puede lograrse mediante el uso de células de hibridoma. Los métodos para producir hibridomas están bien establecidos en la técnica.

Las células transformadas con vectores de expresión de la invención pueden seleccionarse o analizarse para la expresión recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención. Las células recombinantes positivas se expanden y se examinan para determinar los subclones que exhiben un fenotipo deseado, tales como una expresión de alto nivel, propiedades de crecimiento mejoradas, o la capacidad para producir proteínas con características bioquímicas deseadas, por ejemplo, debido a la modificación de la proteína o modificaciones postraduccionales alteradas. Estos fenotipos pueden deberse a las propiedades inherentes de un subclón dado o la mutación. Las mutaciones pueden efectuarse a través del uso de productos

químicos, luz UV de longitud de onda, radiación, virus, mutágenos de inserción, inhibición de la reparación ADN no coincidente, o una combinación de tales métodos.

La Tabla 1 muestra secuencias de polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos VH/VL para un brazo de unión a ENPP3 ilustrativo. La Tabla 13A muestra secuencias de polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos VH/VL para un brazo de unión a CD3ε ilustrativo. La Tabla 16B muestra secuencias de ADN que codifican el anticuerpo NPP3B815.

En algunas modalidades, el brazo de unión a ENPP3 comprende una VH codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con núm. de ident.:316. En algunas modalidades, el brazo de unión a ENPP3 comprende una VL codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con núm. de ident.:317.

En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3ε comprende una VH codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con núm. de ident.:318. En algunas modalidades, el brazo de unión a CD3ε comprende una VL codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con núm. de ident.:319.

En algunas modalidades, la molécula de unión biespecífica a ENPP3×CD3ε comprende un brazo de unión a ENPP3 que comprende una VH codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con núm. de ident.:316 y una VL codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con núm. de ident.:317 y un brazo de unión a CD3ε que comprende una VH codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con

núm. de ident.:318 y una VL codificada por una secuencia de polinucleótidos como se establece en la sec. con núm. de ident.:319.

En algunas modalidades, el agente de unión está codificado por un primer polinucleótido que codifica un spFv que se une a CD3ε, un dominio CH2 y un dominio CH3; un segundo polipéptido que codifica un dominio VH que se une a ENPP3, un dominio CH2 y un dominio CH3; y un tercer polinucleótido que codifica un dominio VL que se une a ENPP3. En algunas modalidades, el primer polinucleótido que codifica un spFv que se une a CD3ε comprende la sec. con núm. de ident.:320. En algunas modalidades, el segundo polinucleótido que codifica un dominio VH que se une a ENPP3, un dominio CH2 y un dominio CH3 comprende la sec. con núm. de ident.:321. En algunas modalidades, el tercer polinucleótido que codifica un dominio VL que se une a ENPP3 comprende la sec. con núm. de ident.:322.

5.8 Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto general, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el agente de unión a ENPP3 (monoespecífica o multiespecífica) proporcionado en la presente un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 es una proteína de unión a ENPP3. En otro aspecto general, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de unión a ENPP3 (monoespecífica o multiespecífica) proporcionado en la presente o un fragmento o una parte de este y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto general, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el agente de unión a ENPP3 (monoespecífica o multiespecífica) proporcionada en la presente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto general, se proporciona en la presente un método para producir una composición farmacéutica que comprende un agente de unión o una región de unión al antígeno de este proporcionado en la presente, que comprende combinar un agente de unión o una región de unión al antígeno de este con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

5.9 Métodos de uso

La actividad funcional de los agentes de unión a ENPP3 (monoespecíficos o multiespecíficos) proporcionados en la presente puede caracterizarse por métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente. Los métodos para caracterizar los agentes de unión incluyen, pero no se limitan a, ensayos de afinidad y especificidad que incluyen Biacore, ELISA y análisis OctetRed; análisis de unión para detectar la unión de anticuerpos a células diana mediante FACS; análisis de unión para detectar la unión de anticuerpos al antígeno diana en las células. De acuerdo con determinadas modalidades, los métodos para caracterizar los agentes de unión incluyen los que se describen a continuación.

Un agente de unión (monoespecífico o multiespecífico) a ENPP3 de la descripción es útil en una variedad de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, métodos de tratamiento terapéutico, tales como el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

En algunas modalidades, los métodos de tratamiento terapéutico comprenden inmunoterapia para el cáncer. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 es útil para activar, promover, aumentar y/o potenciar una respuesta inmunitaria a una célula cancerosa o cancerosa. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 es útil para activar, promover, aumentar y/o potenciar una respuesta inmunitaria a un tumor o célula tumoral. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 es útil para activar, promover, aumentar y/o potenciar una respuesta de células T a un cáncer o células cancerosas. En algunas modalidades, el agente de unión a ENPP3 es útil para activar, promover, aumentar y/o potenciar una respuesta de células T a un tumor o célula tumoral. Los métodos de uso pueden ser métodos in vitro, ex vivo, o in vivo.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para dirigir una célula T a una célula diana que expresa ENPP3 al poner en contacto la célula T con una cantidad efectiva de un agente de unión a ENPP3 x CD3 proporcionado en la presente. En algunas modalidades, en donde la región de unión a CD3 se une a la célula T. En algunas modalidades, la región de unión a ENPP3 se une a la célula diana. En algunas modalidades, la célula diana es una célula tumoral o cancerosa. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para dirigir una célula T a una célula cancerosa o tumoral, que comprende poner en contacto la célula T con una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un agente de unión a ENPP3 x CD3 proporcionado en la presente, en donde la región de unión a

CD3 se une a la célula T. En algunas modalidades, la célula T dirigida induce la liberación de citocinas. En algunas modalidades, la liberación de citocinas aumenta en comparación con una referencia. En algunas modalidades, dicha liberación de citocina se determina al medir IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-α, IFN-γ, o cualquier combinación de estas. En algunas modalidades, el linfocito T dirigido induce la liberación de citocinas y la liberación de una o más de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-α e IFN-γ aumenta en comparación con una referencia. En algunas modalidades, una referencia de citocina es:(a) una citocina medida en una célula o tejido normal que corresponde; (b) una citocina medida en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (c) una citocina medida en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, la célula T dirigida induce la apoptosis en la célula cancerosa o tumoral. En algunas modalidades, cuando la célula T se dirige a la célula cancerosa o tumoral, la célula T induce la citotoxicidad diferencial y la liberación de citocinas. Es decir, un método para dirigir una célula T a una célula cancerosa o tumoral resulta en citotoxicidad dependiente de células T (TDCC) que está inversamente relacionada a la liberación de citocinas de células T. Por ejemplo, en algunas modalidades, la TDCC se aumenta en comparación con una referencia y la liberación de citocinas disminuye en comparación con una referencia. En algunas modalidades, dicha referencia de TDCC es: (a) TDCC medida en un tejido o célula normal correspondiente; (b) TDCC medida en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (c) TDCC medida en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, dicha TDCC se determina midiendo la apoptosis. En algunas modalidades, se aumenta

la apoptosis mediada por caspasa. En algunas modalidades, una referencia de citocina es:(a) una citocina medida en una célula o tejido normal que corresponde; (b) una citocina medida en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (c) una citocina medida en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, dicha liberación de citocina se determina al medir IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-α, IFN-γ, o cualquier combinación de estas.

En algunas modalidades la célula cancerosa expresa ENPP3. En algunas modalidades, la célula cancerosa expresa altos niveles de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, la célula cancerosa expresa niveles bajos de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de referencia de ENPP3 es:(a) un nivel de expresión predeterminado de ENPP3; (b) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido normal correspondiente; (c) un nivel de expresión de ENPP3 medido en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (d) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de ENPP3 se determina al medir el nivel de expresión de la proteína de ENPP3.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para activar una célula T, que comprende poner en contacto la célula T con una cantidad efectiva de la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente, en donde la región de unión a CD3 se une a la célula T. En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para activar una célula T, que comprende poner en contacto la célula T

con una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente.

En algunas modalidades, la activación de células T se mide mediante la expresión de ciertos marcadores en las células T. En algunas modalidades, la activación de células T se mide por el porcentaje de células T positivas para un marcador particular en una población de células T. En algunas modalidades, el marcador de activación de células T es CD25. En algunas modalidades, el marcador de activación de células T es CD69. En algunas modalidades, el método para activar la célula T aumenta la expresión de CD25, CD69 o tanto CD25 como CD69 en las células T. En algunas modalidades, el método para activar la célula T aumenta el porcentaje de células T CD25+, células T CD69+ y/o células T CD25+/CD69+ en la población de células T.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para dirigir un antígeno en la superficie de una célula diana, el método comprende poner en contacto la célula diana con una cantidad efectiva de una proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente, en donde la región de unión a ENPP3 se une a la célula diana. En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para dirigir un antígeno en la superficie de una célula diana, el método comprende poner en contacto la célula diana con una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente, en donde la región de unión a ENPP3 se une a la célula diana. En algunas modalidades, en la presente se proporciona un método para dirigir un antígeno en la superficie de una célula diana, el método comprende poner en contacto la célula diana con una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de

unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente. En algunas modalidades, la célula diana es un una célula cancerosa o tumoral que expresa ENPP3. En algunas modalidades, la célula diana expresa altos niveles de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, la célula diana expresa niveles bajos de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de referencia de ENPP3 es:(a) un nivel de expresión predeterminado de ENPP3; (b) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido normal correspondiente; (c) un nivel de expresión de ENPP3 medido en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (d) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de ENPP3 se determina al medir el nivel de expresión de la proteína de ENPP3. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para destruir o inhibir la proliferación de una célula cancerosa o tumoral, que comprende poner en contacto la célula cancerosa o tumoral con una proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente. En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para matar o inhibir la proliferación de una célula cancerosa o tumoral, que comprende poner en contacto la célula cancerosa o tumoral con una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente. En algunas modalidades, la proteína de unión a ENPP3 x CD3 activa una célula T. En algunas modalidades, la

región de unión a CD3 activa la célula T. En algunas modalidades, el linfocito T activado induce la apoptosis en la célula cancerosa o tumoral. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

En algunas modalidades, la célula cancerosa o tumoral expresa altos niveles de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, la célula cancerosa o tumoral expresa niveles bajos de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de referencia de ENPP3 es:(a) un nivel de expresión predeterminado de ENPP3; (b) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido normal correspondiente; (c) un nivel de expresión de ENPP3 medido en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (d) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de ENPP3 se determina al medir el nivel de expresión de la proteína de ENPP3.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar un cáncer o tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de una proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente. En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar un cáncer o tumor en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente o la composición farmacéutica proporcionada en la presente. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal

papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

En algunas modalidades la célula cancerosa o tumoral expresa ENPP3. En algunas modalidades, la célula cancerosa o tumoral expresa altos niveles de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, la célula cancerosa o tumoral expresa niveles bajos de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de referencia de ENPP3 es:(a) un nivel de expresión predeterminado de ENPP3; (b) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido normal correspondiente; (c) un nivel de expresión de ENPP3 medido en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (d) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de ENPP3 se determina al medir el nivel de expresión de la proteína de ENPP3.

En otro aspecto, se proporciona en la presente el uso de la proteína de unión a ENPP3 x CD3 proporcionada en la presente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o tumor en un sujeto de este. En aun un aspecto adicional, se proporciona en la presente un agente de unión para su uso en el tratamiento de un cáncer o tumor. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado.

En algunas modalidades la célula cancerosa o tumoral expresa ENPP3. En algunas modalidades, la célula cancerosa o tumoral expresa altos niveles de ENPP3 en

comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, la célula cancerosa o tumoral expresa niveles bajos de ENPP3 en comparación con un nivel de expresión de referencia. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de referencia de ENPP3 es:(a) un nivel de expresión predeterminado de ENPP3; (b) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido normal correspondiente; (c) un nivel de expresión de ENPP3 medido en una célula o tejido no canceroso vecino en el mismo sujeto; o (d) un nivel de expresión de ENPP3 en una célula o tejido correspondiente medido en una cohorte de sujetos sanos. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de ENPP3 se determina al medir el nivel de expresión de la proteína de ENPP3.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer o tumor que expresa ENPP3, que comprende administrar o proporcionar la administración de una cantidad efectiva de la proteína de unión a ENPP3 x CD3 al sujeto en donde el sujeto tiene un cáncer o tumor que expresa ENPP3. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón o un carcinoma hepatocelular de hígado. En algunas modalidades, dicho nivel de expresión de ENPP3 se determina al medir el nivel de expresión de la proteína de ENPP3. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. En modalidades específicas, se administra al sujeto una cantidad efectiva.

De acuerdo con modalidades particulares, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se formulan para ser adecuadas para la vía de administración prevista a un sujeto. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas

descritas en la presente pueden formularse para ser adecuadas para la administración intravenosa, subcutánea, o intramuscular.

En caso de conflicto, prevalecerá la especificación, que incluye las definiciones. Como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares ‘‘un’’, ‘‘una’’, y ‘‘el/la’’ incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo determine claramente de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a ‘‘una secuencia de péptidos’’ o ‘‘un tratamiento’’ incluye una pluralidad de tales secuencias, tratamientos, etc. Además, se destaca que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva tal como ‘‘únicamente’’, ‘‘solamente’’ y lo similar en relación con la recitación de los elementos de reivindicación, o el uso de una limitación ‘‘negativa’’.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que la invención abarca cada valor intermedio, hasta una décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera, entre los límites superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor mencionado o intermedio en ese rango especificado. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños y también están abarcados dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido del rango mencionado. Cuando el intervalo mencionado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos, también están incluidos en la invención.

Como se usa en la presente, los valores numéricos se presentan, frecuentemente, en un formato de rango a lo largo de este documento. El uso de un

formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. En consecuencia, el uso de un rango incluye expresamente todos los subrangos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de ese rango y todos los valores numéricos o rangos numéricos, incluidos los enteros dentro de tales rangos y fracciones de los valores o los enteros dentro de los rangos, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Esta construcción se aplica independientemente de la amplitud del rango y en todos los contextos a lo largo de este documento de patente. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un rango de 90-100 % incluye 91-99 %, 92-98 %, 93-95 %, 91-98 %, 91-97 %, 91-96 %, 91-95 %, 91-94 %, 91-93 %, y así sucesivamente. La referencia a un rango de 90-100 % también incluye 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, etc., así como 91,1 %, 91,2 %, 91,3 %, 91,4 %, 91,5 %, etc., 92,1 %, 92,2 %, 92,3 %, 92,4 %, 92,5 %, etc., y así sucesivamente. Además, la referencia a un rango de 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250 incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. En un ejemplo adicional, la referencia a un rango de 25-250, 250-500, 500-1000, 1000-2500, 2500-5000, 5000-25.000, o 5000-50.000 incluye cualquier valor numérico o rango dentro de o que abarca dichos valores, p. ej., 25, 26, 27, 28, 29...250, 251, 252, 253, 254....500, 501, 502, 503, 504..., etc. El uso de una serie de rangos incluye combinaciones de los rangos superior e inferior para proporcionar otro rango. Esta construcción se aplica

independientemente de la amplitud del rango y en todos los contextos a lo largo de este documento de patente. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una serie de rangos tales como 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100, 100-150, incluye rangos tales como 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 5-150, y 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 10-150, y 20-40, 20-50, 20-75, 20-100, 20-150, y así sucesivamente.

En aras de la concisión, en la presente se usan ciertas abreviaturas. Un ejemplo es la abreviatura de una sola letra para representar residuos de aminoácidos. Los aminoácidos y sus correspondientes tres letras y abreviaturas de una sola letra son como sigue:

Alanina	Ala	(A)
Arginina	Arg	(R)
Asparagina	Asn	(N)
Ácido aspártico	Asp	(D)
Cisteína	Cys	(C)
Ácido glutámico	Glu	(E)
Glutamina	Gln	(Q)
Glicina	Gly	(G)
Histidina	His	(H)
Isoleucina	Ile	(I)
Leucina	Leu	(L)
Lisina	Lys	(K)
Metionina	Met	(M)
Fenilalanina	Phe	(F)
Prolina	Pro	(P)
Serina	Ser	(S)
Treonina	Thr	(T)
Triptófano	Trp	(W)
Tirosina	Tyr	(Y)
Valina	Val	(V)

La invención se describe generalmente en la presente con el uso de lenguaje afirmativo para describir las numerosas modalidades. La descripción también incluye específicamente modalidades en las cuales el tema particular se excluye, en su totalidad o

en parte, tal como sustancias o materiales, etapas y condiciones de métodos, protocolos, procedimientos, ensayos o análisis. Por lo tanto, aunque la invención generalmente no se expresa en la presente en términos de lo que la descripción no incluye, los aspectos que no se incluyen expresamente en la presente se describen, no obstante, en la presente.

En la presente se describen modalidades particulares de esta invención. Después de leer la descripción anterior, las variaciones de las modalidades descritas pueden resultar evidentes para las personas que trabajan en la técnica, y se espera que los expertos en la técnica puedan usar tales variaciones según corresponda. En consecuencia, se pretende que la invención se practique de cualquier otra manera a la descrita específicamente en la presente, y que la invención incluya todas las modificaciones y equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones anexadas a esto permitidas por la ley aplicable. Además, la invención abarca cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas sus variaciones posibles a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente o que sea claramente contradictorio de cualquier otra manera en el contexto.

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, números de acceso y otras referencias citadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia en su totalidad como si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para incorporarse como referencia. Las publicaciones analizadas en la presente se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Ninguna parte de la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de

publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas reales de publicación y, por lo tanto, puede ser necesario confirmarlas independientemente.

Se han descrito varias modalidades de la invención. Sin embargo, se entenderá que pueden realizarse varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, las descripciones en la sección Experimental están destinadas a ilustrar, pero sin limitar, el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

6. MODALIDADES

1. Un agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une a un epítopo de ENPP3.
2. El agente de unión de la modalidad 1, en donde el epítopo de ENPP3 se selecciona del grupo que consiste en sec. con núm. de ident.:295-297, DVP y sec. con núm. de ident.:299-305.
3. El agente de unión de la modalidad 1, en donde la región de unión al antígeno comprende un dominio VH y VL seleccionado del grupo que consiste en:
   (a) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:23;
   (b) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:45, y un dominio VL

que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:46;

(c) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:69 o la sec. con núm. de ident.:70;

(d) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:92;

(e) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:114 o sec. con núm. de ident.:115;

(f) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:135 o sec. con núm. de ident.:136;

(g) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:159; y

(h) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:178.

4. El agente de unión de la modalidad 3, en donde las secuencias de CDR se seleccionan del grupo que consiste en:

(a1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(a2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:7, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:8, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(a3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:10, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(a4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:14, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16;

(a5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:17, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(b1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:25, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(b2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:30, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:31, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(b3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:32, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:33, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(b4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:34, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:35, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:36, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:37, la LCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:38, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:39;

(b5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:40, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:41, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:42, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:43, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(c1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:47, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:48, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(c2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:53, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:54, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(c3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:55, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:56, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(c4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:57, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:58, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:59, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:60, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:61, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:62;

(c5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:63, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:64, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:65, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:66, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de QIS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(d1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:71, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:72, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(d2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:77, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:78, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(d3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:79, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:80, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(d4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:81, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:82, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:83, la LCDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:84, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:85, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86;

(d5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:87, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:88, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:89, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:90, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(e1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:93, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:94, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(e2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:99, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:100, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(e3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:101, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:102, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(e4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:103, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:104, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:105, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:106, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:107, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:108;

(e5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:109, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:110, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:111, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:112, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(f1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:116, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:117, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(f2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:121, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:122, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(f3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:123, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:124, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(f4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:125, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:126, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:127, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:128, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:129;

(f5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:130, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:131, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:132, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:133, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(g1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:137, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:138, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(g2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:143, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:144, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(g3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:145, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:146, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(g4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:147, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:148, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:149, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:150, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:151, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:152;

(g5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:153, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:154, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:155, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:156, la LCDR2

comprende la secuencia de aminoácidos de AAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(h1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:160, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(h2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:164, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:165, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(h3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:166, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:167, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(h4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:168, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:169, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:170, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:171, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86; y

(h5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:172, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:173, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:174, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:175, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de VAS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

5. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 4, en donde la región de unión al antígeno comprende un dominio VH y un dominio VL seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23;

(b) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:45 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:46;

(c) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:69;

(c) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:70;

(d) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:92;

(e) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:114;

(e) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:115;

(f) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:135;

(f) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:136;

(g) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:159; y

(h) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:178.

6. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 5, en donde el agente de unión es una proteína biespecífica o una proteína multiespecífica.

7. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 6, que comprende además una región constante de la inmunoglobulina (Ig), o un fragmento de la región constante de la Ig, en donde opcionalmente el fragmento de la región constante de la Ig es una región Fc o un dominio CH3.

8. El agente de unión de la modalidad 7, en donde la región constante de la Ig, el fragmento de la región constante de la Ig, la región Fc, o el dominio CH3 comprende al menos una mutación.

9. El agente de unión de la modalidad 8, en donde la al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en L234A/L235A/D265S, F234A/L235A, L234A/L235A, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/

L234V/L235A/G236-eliminado/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S y S228P/F234A/L235A/G236-eliminado/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el Índice EU.

10. El agente de unión de la modalidad 8, en donde la al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en T366S/L368A/Y407V, T366W, T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366L, F405W, T394W, K392L, T394S, Y407T, Y407A, , L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, T366L/K392L/T394W, L351Y/Y407A, L351Y/Y407V, T366A/K409F, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V y T350V/T366L/K392L/T394W, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

11. El agente de unión de la modalidad 8, en donde el agente de unión comprende mutaciones de botón en ojal, en donde las mutaciones de botón comprenden T366S/L368A/Y407V, y la mutación de ojal comprende T366W.

12. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 11, en donde el agente comprende una proteína biespecífica que comprende una región de unión al antígeno que se une a un segundo antígeno distinto de ENPP3.

13. El agente de unión de la modalidad 12, en donde el segundo antígeno es el cúmulo de diferenciación 3ε (CD3ε).

14. Un agente de unión que comprende una primera región de unión al antígeno que se une a ENPP3 y una segunda región de unión al antígeno que se une a CD3ε,

en donde la primera región de unión al antígeno que se une a ENPP3 comprende una VH y una VL seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:23;

(b) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:45, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:46;

(c) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:69 o la sec. con núm. de ident.:70;

(d) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:92;

(e) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:114 o sec. con núm. de ident.:115;

(f) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:135 o sec. con núm. de ident.:136;

(g) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:159; y

(h) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:178.

15. El agente de unión de la modalidad 14, en donde en la segunda región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:201.

16. El agente de unión de la modalidad 14, en donde la primera región de unión al antígeno que se une a ENPP3 comprende secuencias CDR seleccionadas del grupo que consiste en:

(a1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(a2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:7, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:8, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(a3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(a4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:12, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:14, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16;

(a5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:17, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(b1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:25, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(b2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:30, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:31, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(b3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:32, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:33, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:27, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:28, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(b4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:34, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:35, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:36, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:37, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:38, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:39;

(b5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:40, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:41, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:42, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:43, la LCDR2

comprende la secuencia de aminoácidos de DAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29;

(c1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:47, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:48, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(c2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:53, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:54, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(c3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:55, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:56, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:49, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:50, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:51, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(c4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:57, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:58, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:59, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:60, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:61, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:62;

(c5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:63, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:64, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:65, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:66, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de QIS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:52;

(d1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:71, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:72, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(d2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:77, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:78, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(d3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:79, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:80, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:73, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:74, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:75, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(d4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:81, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:82, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:83, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:84, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:85, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86;

(d5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:87, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:88, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:89, la LCDR1 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:90, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(e1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:93, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:94, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(e2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:99, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:100, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(e3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:101, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:102, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:95, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:96, la LCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:97, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(e4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:103, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:104, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:105, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:106, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:107, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:108;

(e5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:109, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:110, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:111, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:112, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:98;

(f1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:116, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:117, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(f2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:121, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:122, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(f3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:123, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:124, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:118, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:119, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(f4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:125, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:126, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:127, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:128, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:129;

(f5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:130, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la

sec. con núm. de ident.:131, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:132, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:133, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:120;

(g1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:137, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:138, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(g2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:143, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:144, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(g3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:145, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:146, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:139, la LCDR1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:140, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:141, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(g4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:147, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:148, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:149, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:150, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:151, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:152;

(g5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:153, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:154, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:155, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:156, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de AAS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:142;

(h1) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:160, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(h2) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:164, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:165, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(h3) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:166, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:167, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:161, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:162, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:163, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76;

(h4) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:168, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:169, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:170, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:171, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:86;y

(h5) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:172, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:173, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:174, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:175, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de VAS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:76.

17. El agente de unión de la modalidad 15, en donde la segunda región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:179, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:180, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184;

(b) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:185, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:186, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184;

(c) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:187, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:188, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184;

(d) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:189, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:190, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:191, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:192, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:193, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:194; y

(e) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:195, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:196, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:197, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:198, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184.

18. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 14 a 17, en donde

(i) la primera región de unión comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23; y

(ii) la segunda región de unión comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:201.

19. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 12 a 18, en donde la primera región de unión al antígeno comprende un Fab, y la segunda región de unión al antígeno comprende un fragmento de scFv engrapado (spFv).

20. El agente de unión de la modalidad 19, en donde el spFv comprende al menos un enlace disulfuro entre la VH o VL y el enlazador.

21. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 12 a 20, en donde el agente de unión comprende además una región constante de la inmunoglobulina (Ig), un fragmento de la región constante de la Ig, en donde opcionalmente el fragmento de la región constante de la Ig es una región Fc o un dominio CH3.

22. Un agente de unión que comprende

(i) un primer polipéptido que comprende un spFv que se une a CD3ε, un dominio CH2 y un dominio CH3;

(ii) un segundo polipéptido que comprende un dominio VH que se une a ENPP3, un dominio CH2 y un dominio CH3; y

(iii) un tercer polipéptido que comprende un dominio VL que se une a ENPP3,

en donde el spFv que se une a CD3ε comprende un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:201; y

en donde el segundo y tercer polipéptidos comprenden una VH y una VL que se unen a ENPP3, en donde las VH y VL que se unen a ENPP3 se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:22, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:23;

(b) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:45, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:46;

(c) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:68, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:69 o la sec. con núm. de ident.:70;

(d) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:91, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:92;

(e) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:113, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:114 o sec. con núm. de ident.:115;

(f) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:134, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:135 o sec. con núm. de ident.:136;

(g) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:158, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:159; y

(h) un dominio VH que comprende una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de una VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:177, y un dominio VL que comprende una LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de una VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:178.

23. El agente de unión de la modalidad 22, en donde:

(i) el spFv que se une a CD3ε comprende CDR seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:179, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:180, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184;

(b) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:185, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:186, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184;

(c) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:187, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:188, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:181, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:182, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de

la sec. con núm. de ident.:183, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184;

(d) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:189, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:190, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:191, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:192, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:193, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:194; y

(e) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:195, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:196, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:197, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:198, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:184; y

(i) el Fab que se une a ENPP3 comprende:

(a) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:1; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos

de la sec. con núm. de ident.:3; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(b) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:7; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:8; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(c) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:3; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:4; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:5; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6;

(d) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:14; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16; y

(e) en el dominio VH que se une a ENPP3, la HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:17; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:18; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:19; y en el dominio VL que se une a ENPP3, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de GAS; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:6.

24. El agente de unión de la modalidad 22 o 23, en donde el spFv que se une a CD3ε comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:200, y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:201; el

dominio VH que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y el dominio VL que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23.

25. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 22 a 24, en donde el spFv que se une a CD3ε comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:248; el dominio VH que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22, y el dominio VL que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23.
26. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 22 a 25, en donde:
    (i) el primer polipéptido que comprende un spFv que se une a CD3ε, un dominio CH2 y un dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:255;
    (ii) el segundo polipéptido que comprende un dominio VH que se une a ENPP3, un dominio CH2 y un dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:256; y
    (iii) el tercer polipéptido que comprende un dominio VL que se une a ENPP3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:257.

27. El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 22 a 26, en donde el spFv comprende al menos un enlace disulfuro entre la VH o VL y el enlazador.
28. Una composición que comprende el agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 27, y un portador farmacéuticamente aceptable.

29. Un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una VH, una VL, o tanto una VH como una VL del agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 27.
30. Un vector que comprende el polinucleótido de la modalidad 29.
31. Un vector que comprende el polinucleótido de la modalidad 29.
32. Un kit que comprende el agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 27.
33. Un método para preparar un agente de unión que se une a un epítopo de ENPP3, que comprende cultivar la célula de la modalidad 31 para expresar el agente de unión.
34. Un método para dirigir una célula T a una célula diana que expresa ENPP3, que comprende poner en contacto la célula T con una cantidad efectiva del agente de unión de una cualquiera de las modalidades 12 a 27 o una composición que comprende el agente de unión y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3ε se une a la célula T y la región de unión al antígeno que se une a ENPP3 se une a la célula diana.
35. Un método para tratar un cáncer o tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad efectiva del agente de unión de una cualquiera de las modalidades 12 a 27 o una composición que comprende el agente de unión y un portador farmacéuticamente aceptable al sujeto.
36. El método de la modalidad 35, en donde el cáncer o tumor se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), un cáncer renal papilar, un cáncer uterino endometrioide, un cáncer

de ovario endometrioide, un cáncer colorrectal, un andenocarcinoma de pulmón, o un carcinoma hepatocelular de hígado.

7. Ejemplos

La siguiente es una descripción de los diversos métodos y materiales usados en los estudios, y se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una completa descripción y detalle de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni pretenden representar que los experimentos a continuación se realizaron y son todos los experimentos que pueden realizarse. Debe entenderse que las descripciones ilustrativas escritas en tiempo presente no se realizaron necesariamente, sino que las descripciones pueden realizarse para generar los datos y lo similar asociados con las enseñanzas de la presente descripción. Se han realizado esfuerzos para garantizar precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algún error y desviación del experimento.

A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Celsius (°C), y la presión es o está cerca de la atmosférica. Se usan abreviaturas estándar, que incluyen las siguientes: pb = pares de base; kb = kilobase(s); s o seg = segundo(s); min = minuto(s); h o hr = hora(s) aa = aminoácido(s); kb = kilobase(s); nt = nucleótido(s); pg. = picogramo; ng = nanogramo; µg = microgramo; mg = miligramo; g = gramo; kg = kilogramo; pl o pL = picolitro(s); dl o dL = decilitro; µl or µL = microlitro; ml o mL = mililitro;

l o L = litro; µM = micromolar; mM = milimolar; M = molar; kDa = kilodalton; i.m. = intramuscular; i.p. = intraperitoneal; SC o SQ = subcutáneo; QD = diariamente; BID = dos veces al día; QW = semanal; TIW = tres veces a la semana; QM = mensual; HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento; BW = peso corporal; U = unidad; ns = estadísticamente no significativo; PBS = solución salina regulada con fosfato; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; NHS = N-hidroxisuccinimida; HSA = albúmina sérica humana; BSA = albúmina sérica bovina; DMEM = medio Eagle modificado por Dulbeco; GC = copia de genoma; EDTA = ácido etilendiaminotetracético;

Los siguientes métodos experimentales se emplearon a lo largo de los ejemplos descritos en la presente.

7.1 Ejemplo 1: Generación de anticuerpos que se unen a ENPP3

Los anticuerpos anti-ENPP3 se generaron usando la plataforma de ratón transgénico Ablexis, usando técnicas conocidas en la técnica. Brevemente, se inmunizaron ratones Ablexis Kappa usando un plásmido que comprende una secuencia de ADN ENPP3 humana de longitud completa. Las células B se recuperaron siguiendo protocolos estándar, y los sobrenadantes de las células B clasificadas se seleccionaron mediante la proteína MSD para determinar su unión a ENPP3 humana (Uniprot ID: O14638). Se seleccionaron quince aglutinantes basado en la unión a ENPP3 humana. La cascada de selección se muestra en la **Figura 1** . Se seleccionaron once aglutinantes para una caracterización adicional (**Figuras 1-2** y **Tablas 1-11**). Las afinidades de unión para aglutinantes seleccionados para ENPP3 humana y de mono cynomolgus se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Afinidades de unión de aglutinantes seleccionados con ENPP3 humano y cyno.

Anticuerpo	Unión a ENPP3 humana KD (M)	Unión a ENPP3 de cyno KD (M)
NPP3B100	9,77E-11	Sin unión hasta 300 nM
NPP3B101	1,93E-10	9,58E-09
NPP3B107	1,33E-10	~20 nM (bifásico)
NPP3B56	2,15E-10	~2 nM (bifásico)
NPP3B60	4,48E-10	~1 nM (bifásico)
NPP3B61	4,43E-10	1,09E-07
NPP3B62	2,58E-10	1,20E-08
NPP3B64	5,36E-10	~2 nM (bifásico)
NPP3B68	N/A	N/A
NPP3B86	2,45E-10	~5 nM (bifásico)
NPP3B98	1,29E-10	~1 nM (bifásico)

A continuación, se evaluaron los aglutinantes en cuanto a, entre otras cosas, similitud de secuencia de CDR, características biofísicas y características de desarrollo, como afinidad de unión a ENPP3 humana y cynomolgus, hidrofobicidad, unión no específica, cromatografía de interacción cruzada (CIC, por sus siglas en inglés), estabilidad conformacional y unión basada en SPR a otros miembros de la familia ENPP. Según estos resultados, se seleccionaron 5 aglutinantes de ENPP3 (**Figura 1**) para una evaluación funcional adicional.

7.1.1 Estudios de epítopos

El epítopo en ENPP3 humana se determinó por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS).

Experimento de intercambio para HDX-MS. La reacción de intercambio se inició mezclando 10 µl de ENPP3 humana recombinante 6 µM (Sino Biological; **sec. con**

núm. de ident.: 327), que incluye los residuos 46-875 de ectonucleótido de pirofosfatasa/fosfodiesterasa humana (Uniprot ID O14638), con o sin exceso 1,2 molar de ligando y 30 µl de H2O o un regulador deuterado (tal como MES 20 mM, pH 6,0, NaCl 150 mM en D2O al 95 %; 20 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl en D2O al 95 %; o DPBS, pH 7,2 en D2O al 90 %). La mezcla de reacción se incubó durante 15, 50, 150, 500 o 1.500 s a 23 °C. La solución de intercambio se inactivó mediante la adición de 40 µL enfriados de urea 8 M, clorhidrato de TCEP 1 M, pH 4,0 y se analizó inmediatamente.

ENPP3 (Uniprot ID O14638**) (sec. con núm. de ident.: 327):**

HHHHHHHHHHGLNDIFEAQKIEWHERKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCR
CDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLEASLCSCSDDCLQRKDCC
ADYKSVCQGETSWLEENCDTAQQSQCPEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPN
INKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDVNLNKNFSLSSKE
QNNPAWWHGQPMWLTAMYQGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEERI
STLLKWLDLPKAERPRFYTMYFEEPDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEGL
KQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPRIRAHNIPHDF
FSFNSEEIVRNLSCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLFVDQQWLAVRSK
SNTNCGGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAP
NNGTHGSLNHLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQV
NQMLNLTQEEITATVKVNLPFGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSY
TVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLADKNITHGFLYPPASNRTSDS
QYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAP
DEITKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDVLPFIIPHRPTNVESCPEGK
PEALWVEERFTAHIARVRDVELLTGLDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETTI

Procedimiento general para la adquisición de datos HDX-MS. La preparación de muestras HDX-MS se realizó con el sistema HDx automatizado (LEAP Technologies, Morrisville, NC). Las columnas y la bomba eran; proteasa, proteasa tipo XIII (proteasa de Aspergillus saitoi, tipo XIII)/columna de pepsina (p/p, 1: 1; 2,1 x 30 mm) (NovaBioAssays Inc., Woburn, MA); trampa, Precolumna ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (2,1 x 5 mm) (Waters, Milford, MA), analítica, Accucore C18 (2,1 x 100 mm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); y bomba LC, VH-P10-A (Thermo Fisher Scientific). La bomba de carga (desde la columna de proteasa a la columna trampa) se ajustó a 600 µl/min con 0,1 % de ácido fórmico acuoso. La bomba de gradiente (desde la columna de trampa a la columna analítica) se ajustó de 9 % a 33 % de acetonitrilo en ácido fórmico acuoso al 0,1 % en 20 min a 100 µl/min.

Adquisición de datos MS. Los análisis por espectrometría de masa se realizaron usando un espectrómetro de masas LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) con la temperatura capilar de 275 °C, resolución de 120.000 y rango de masa (m/z) 300 – 1500.

Extracción de datos DX-MS. Se usó BioPharma Finder 2.0 (Thermo Fisher Scientific) para la identificación de péptidos de muestras no deuteradas antes de los experimentos HDX. Se usó HDExaminer, versión 2.5 (Sierra Analytics, Modesto, CA) para extraer valores de centroide de los archivos de datos sin procesar de MS para los experimentos HDX.

Análisis de datos HDX-MS. Los datos extraídos de HDX-MS se analizaron adicionalmente en Excel para ocultar la incorporación de deuterio a la energía libre de plegamiento (ΔG) descrita como método exponencial extendido en la referencia (Y.

Hamuro “Quantitative Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry” J. Am. Soc. *Mass Spectrom.* **2021**, 32, 2711-2727). Los segmentos con un cambio de energía libre tras la unión del ligando menor que –1 kcal/mol (ΔΔG < –1 kcal/mol) se consideran epítopos identificados por HDX-MS.

Resultados. El epítopo de NPP3W6 contra NP4D6 y NPP3B15 fueron los residuos 762-780 (PDEITKHLANTDVPIPTHY (sec. con núm. de ident.: 328)).

El epítopo de NPP3W6 contra NPP3B56 fueron los residuos 412-415 (PHDF (sec. con núm. de ident.: 295)), 673-676 (PSES (sec. con núm. de ident.: 296)), 762-768 (PDEITKH (sec. con núm. de ident.: 297)), y 773-775 (DVP).

Los epítopos de NPP3W6 contra NPP3B62 fueron los residuos 572-576 (SLECF (sec. con núm. de ident.: 299)), 582-586 (NSTQL (sec. con núm. de ident.: 300)) y 673-681 (PSESQKCSF (sec. con núm. de ident.: 301)).

Los epítopos de NPP3W6 contra NPP3B98 fueron los residuos 556-562 (VSKFSVC (sec. con núm. de ident.: 302)), 612-616 (RPRVL (sec. con núm. de ident.: 303)), 621-624 (DHCL (sec. con núm. de ident.: 304)), y 856-860 (QPVSE (sec. con núm. de ident.: 305)).

Los epítopos de NPP3W6 contra NPP3B86 fueron los residuos 601-602 (TA) y 695-707 (PPASNRTSDSQYD (sec. con núm. de ident.: 329)).

La numeración de secuencia de NPP3W6 se convirtió a la de la secuencia nativa (Uniprot ID: O14638).

7.2 Ejemplo 2. Generación y caracterización de anticuerpos biespecíficos de ENPP3 x CD3.

7.2.1 Ingeniería de los anticuerpos de ENPP3 x CD3

El brazo de unión a ENPP3 de los anticuerpos biespecíficos ENPP3xCD3 se diseñó para comprender un brazo Fab anti-ENPP3 derivado de mAb ENPP3 descritos en el Ejemplo 1 (secuencias mostradas en **las Tablas 1-11**). Para preparar el anticuerpo biespecífico, se diseñaron por ingeniería VH1 y VL1 de los mAb de ENPP3 en formatos VH1-CH1-bisagra-CH2-CH3 (cadena pesada 1, HC1) y VL1-CL (cadena ligera 1, LC1) respectivamente y se expresaron como IgG1. También se diseñaron por ingeniería mutaciones diseñadas para promover la heterodimerización selectiva (mutación "agujero" T366S, L368A e Y407V) en el dominio Fc de HC1. Las regiones variables anti-ENPP3 parentales se formatearon como un Fab en el anticuerpo biespecífico.

Los brazos de unión a CD3 de los anticuerpos de ENPP3xCD3 se diseñaron usando los dominios VH y VL del anticuerpo CD3B2030-N106A, descritos en WO2022/201053, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Las secuencias del anticuerpo CD3B2030-N106A se muestran en la **Tabla 13B** . El CD3B2030-N106A es un brazo de unión a CD3 de afinidad baja-media. La VH y la VL del anticuerpo CD3B2030-N106A se diseñaron como un dominio scFv o un dominio scFv estabilizado (o engrapado) descrito en la presente como spFv, en orientación VL-enlazador-VH-Fc.

La generación del fragmento scFv derivado del anticuerpo CD3B2030-N106A se describe en WO2022/201053, que se incorpora en la presente como

referencia en su totalidad. Se usó la VH de la sec. con núm. de ident.: 202 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 203 para generar el scFv.

Se diseñaron brazos de unión a CD3 adicionales de los anticuerpos de ENPP3xCD3 usando los dominios VH y VL del anticuerpo CD3W245. La generación del fragmento scFv derivado del anticuerpo CD3W245 se describe en WO2021240388, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Se usó la VH de la sec. con núm. de ident.: 220 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 221 para generar el scFv.

La Tabla 17A muestra los anticuerpos biespecíficos diseñados.

Tabla 17A Anticuerpos biespecíficos de ENPP3 x CD3

Anticuerpo biespecífico ID	Brazo de ENPP3	Brazo de CD3
NPP3B194	NPP3B56	CD3B2030-N104A
NPP3B199	NPP3B62	CD3B2030-N104A
NPP3B232	NPP3B98	CD3B2030-N104A
NPP3B239	NPP3B107	CD3B2030-N104A
NPP3B220	NPP3B86	CD3B2030-N104A
NPP3B276	NPP3B56	CD3W245
NPP3B278	NPP3B58	CD3W245
NPP3B281	NPP3B62	CD3W245
NPP3B314	NPP3B98	CD3W245
NPP3B321	NPP3B107	CD3W245
NPP3B302	NPP3B86	CD3W245

El scFv estabilizado (spFv) se generó usando la VH y la VL del aglutinante CD3B2030-N106A mediante ingeniería de enlaces disulfuro entre la VH y el enlazador y entre la VL y el enlazador. Se identificaron dos posiciones marco expuestas en la superficie estructuralmente conservadas (puntos de anclaje) que no participan en la unión al antígeno, una en la VH en la posición H105 y otra en la VL en la posición L42 (numeración Chothia), y se mutaron en residuos de cisteína (Cys) para generar la VH

de la sec. con núm. de ident.: 200 y VL de la sec. con núm. de ident.: 201. Se usó un enlazador flexible de secuencia GGGSGGSGGCPPCGGSGG (sec. con núm. de ident.: 292) que comprende dos residuos Cys para conjugar la VL y la VH en el formato VL-enlazador-VH (LH) produciendo el spFv de la sec. con núm. de ident.: 248. La distancia y ubicación de los residuos Cys del enlazador y los residuos Cys de la VH y la VL es crítica para la formación de los enlaces disulfuro entre los residuos Cys del enlazador y cada punto de anclaje de la VH y la VL.

El scFv engrapado en el VL-enlazador-VH se diseñó por ingeniería además en una cadena pesada 2 (HC2) y se expresó como IgG1. Además, la heterodimerización de Fc (mutación “botón” T366W) se diseñó en el dominio Fc de HC2.

7.2.2 Destrucción in vitro usando Ab biespecíficos ENPP3 x CD3

La capacidad de 5 aglutinantes de ENPP3 emparejados con el brazo scFv CD3B2030-N106A o CD3W245 en el formato de anticuerpo biespecífico, para inducir la destrucción de células tumorales mediada por células T se evaluó usando un instrumento Incucyte (lapso de tiempo de células vivas) frente a un panel de líneas celulares de cáncer (**Figuras 2-8**) con diferentes niveles de expresión de ENPP3: alto (A704), medio (VMRCRCW, HepG2) y negativo (HepG2 ENPP3 KO). Los cinco Ab biespecíficos ENPP3xCD3 basados en CD3B2030-N106A, NPP3B194, NPP3B199, NPP3B220, NPP3B232 y NPP3B239 indujeron citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis en una relación de célula efectora a diana (E:T) de 3:1 en todas las líneas celulares positivas a ENPP3 (A704, VMRCRCW y HepG2), mientras que no se observó destrucción frente a la línea celular negativa (HepG2 ENPP3 KO) **(Figuras 2-4**). Como

se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con el anticuerpo de control NullxCD3 (79C3B615) en ninguna de las líneas celulares analizadas. Los seis Ab biespecíficos ENPP3xCD3 basados en CD3W245 probados, NPP3B302, NPP3B321, NPP3B276, NPP3B278, NPP3B281 y NPP3B314 indujeron citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis en una relación de células efectoras a diana (E:T) de 3:1 en todas las líneas celulares positivas a ENPP3 (A704, VMRCRCW y HepG2), mientras que no se observó destrucción frente a la línea celular negativa (HepG2 ENPP3 KO) (**Figuras 5 y 6**). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con el anticuerpo de control NullxCD3 (79C3B615) en ninguna de las líneas celulares analizadas. Los resultados mostraron que los tres anticuerpos biespecíficos seleccionados NPP4B194, NPP3B232 y NPP3B239 exhibieron una potente destrucción in vitro y activación de células T (**Figura 7**). Además, el panel seleccionado de anticuerpos biespecíficos exhibió una potente destrucción in vitro en relaciones más bajas de efector a diana (E:T) (**Figura 8**).

7.2.3 Datos funcionales in vitro para aglutinantes ENPP3 seleccionados emparejados con un unión de brazo CD3 seleccionado de NPP3B815 a células tumorales y células T

La capacidad de los 3 principales aglutinantes de ENPP3 emparejados con CD3B2030-N106A para inducir la destrucción de células tumorales mediada por células T se evaluó usando un instrumento Incucyte (lapso de tiempo de células vivas) frente a un panel de líneas celulares cancerosas (**Figura 10**) con diferentes niveles de expresión de ENPP3: alto (A704), medio (VMRCRCW) y negativo (HepG2 ENPP3-KO).

Los tres Ab biespecíficos ENPP3xCD3 basados en CD3B2030-N106A, NPP3B194, NPP3B232 y NPP3B239 indujeron citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis en una relación de célula efectora a diana (E:T) de 3:1 en todas las líneas celulares positivas a ENPP3 (A704 y VMRCRCW), mientras que no se observó muerte contra la línea celular negativa (HepG2 ENPP3-KO) (**Figura 10**). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con el anticuerpo de control NullxCD3 (79C3B615) en ninguna de las líneas celulares analizadas. La destrucción de células tumorales mediada por células T se evaluó adicionalmente para NPP3B194 y NPP3B232 en la línea celular VMRCRCW en una relación múltiple de célula efectora a diana (E:T) de 3:1, 1:1 y 1:3 y se observó citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis con ambas moléculas.

7.2.4 Reactividad cruzada con otros miembros de la familia ENPP

Para evaluar la especificidad de los aglutinantes a ENPP3 en comparación con otros miembros de la familia ENPP, se evaluó la unión celular en células CHOK1 que sobreexpresan ENPP1, ENPP2 o ENPP3 (**Figura 9**). NPP3B194, NPP3B232 y NPP3B239 exhibieron una unión dependiente de la dosis solo a las células CHOK1 que sobreexpresan ENPP3. Todos los Ab analizados no mostraron ninguna unión a la línea celular CHOK1 parental negativa a ENPP3 o a las células CHOK1 que sobreexpresan ENPP1 o ENPP2. No se observó unión a ninguna de las líneas celulares con el anticuerpo de control de isotipo (79C3B613).

7.2.5 Datos in vivo para aglutinantes de ENPP3 emparejados con el brazo de CD3 en el modelo RCC CDX, VMRC

Los ratones que portan xenoinjertos SC VMRCRCW establecidos se dosificaron IP con NPP3B194, NPP3B232 dos veces por semana a 5, 1 y 0,5 mg/kg, o anticuerpo de control NullxCD3 (5 mg/kg) durante un total de 8 dosis (n=10/grupo). Se observó una eficacia antitumoral significativa con el tratamiento con NPP3B194 a 5,1 y 0,5 mg/kg a lo largo del tiempo ($p<0,001$) con 85,5 %, 81,7 % y 70,7 % Δ de inhibición del crecimiento tumoral (TGI), respectivamente, en comparación con los ratones de control tratados con el anticuerpo NullxCD3 (**Figuras ¡Error! Fuente de referencia no encontrado).** Se observó una eficacia antitumoral limitada con el tratamiento con NPP3B232 a 5,1 y 0,5 mg/kg a lo largo del tiempo con 21 %, 29 % y 20 % Δ de inhibición del crecimiento tumoral (TGI), respectivamente, en comparación con ratones de control tratados con anticuerpo NullxCD3 (¡Error! Origen de referencia no encontrado). No se observaron cambios significativos en el peso corporal del ratón con ninguna de las condiciones de tratamiento.

7.2.6 Datos in vivo para los aglutinantes ENPP3 seleccionados emparejados con el brazo CD3 seleccionado en el modelo HCC CDX, HepG2

Los ratones que portan xenoinjertos SC HepG2 establecidos se dosificaron IP con NPP3B194 o NPP3B232 dos veces por semana a 5, 1 y 0,05 mg/kg, o con anticuerpo de control NullxCD3 durante un total de 6 dosis (n=10/grupo).

El tratamiento con NPP3B194 a 1 y 5 mg/kg dio como resultado un %ΔTGI de 104 % y 90 %, respectivamente (p<0,0001) en comparación con los controles el día 52 y condujo a 7/9 y 2/8 CR, respectivamente el día 61.

El tratamiento con NPP3B239.003 a 1 y 10 mg/kg dio como resultado ΔTGI de 84 % y 103 %, respectivamente (p<0,0001) en comparación con los controles el día 52 y condujo a 1/4 y 3/8 CR, respectivamente.

Se observó una mayor pérdida de peso corporal en los grupos que tenían menos respuesta antitumoral, lo que indica caquexia.

7.3 Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos biespecíficos de ENPP3 x CD3

Se seleccionó el anticuerpo biespecífico (BsAb) NPP3B815 para su caracterización adicional. El anticuerpo NPP3B815 comprende un fragmento variable monocatenario anti-CD3 que presenta un enlazador "engrapado" (spFv) en la cadena pesada 1 (HC1), derivado del aglutinante CD3B2030 N106A CD3. El spFv comprende un enlazador que tiene un motivo central “C_1PPC_2” (sec. con núm. de ident.: 323) en donde C_1 forma un enlace disulfuro con (en el caso del spFv en la orientación “ligeramente pesada”) una cisteína diseñada en la posición L42 (numeración de Chothia) en el dominio ligero variable y C_2 forma un enlace disulfuro con una cisteína diseñada en la posición H105 en el dominio pesado variable. La cadena pesada 1 comprende la mutación "botón": T366W. La cadena pesada 2 (HC2) comprende la región Fab anti-ENPP3, derivada del anticuerpo NPP3B56 y las mutaciones "ojal": T366S, L368A, Y407V. La Tabla 1 muestra las secuencias de aminoácidos de CDR y

VH/VL para el brazo de unión a ENPP3. La Tabla 13A muestra las secuencias de aminoácidos de CDR y VH/VL para el brazo de unión a CD3. La Tabla 16A muestra secuencias de longitud completa del anticuerpo NPP3B815. La Tabla 16B muestra secuencias de ADN que codifican el anticuerpo NPP3B815. La Tabla 16C muestra secuencias de ADN optimizadas con codones que codifican el anticuerpo NPP3B815.

Se evaluó NPP3B815, entre otras cosas, en cuanto a pureza, afinidad de unión, estabilidad térmica, solubilidad, estabilidad en suero, unión no específica, viscosidad y potencial de agregación. NPP3B815 mantuvo una alta pureza, no mostró cambios conformacionales después de 2 semanas a una prueba de estrés a 37 °C, exhibió una alta solubilidad con viscosidad y estabilidad aceptables y un alto porcentaje de monómero (a 150 mg/ml) a 40 °C, mantuvo la unión diana en suero humano. y no mostró evidencia de unión no específica. En resumen, NPP3B815 cumplió con los criterios ideales o aceptables, como lo demuestran los resultados de diferentes ensayos biofísicos, y las propiedades intrínsecas generales favorecieron la capacidad de fabricación.

El scFv CD3B2030-N106A-LH específico de CD3 se generó mediante una fusión genética de la cadena ligera (VL) de la región variable y la cadena pesada (VH) de la región variable con un enlazador flexible. El scFv recapitula la especificidad de unión al antígeno y en gran medida la afinidad de un Fv parental. Sin embargo, las moléculas que contienen scFv son propensas a la agregación debido a la baja estabilidad térmica y la separación transitoria y la reasociación intermolecular VL/VH (''respiración'').

Ambos pasivos se abordaron mediante el 'engrapado' de scFv, abreviado como spFv. Para este fin, se diseñaron 2 enlaces disulfuro entre el enlazador flexible y las posiciones de anclaje de los dominios VL y VH (uno en cada uno). Esta nueva

estrategia es compatible en las orientaciones VL-VH y VH-VL para casi todos los dominios Fv. La caracterización extensa de varias moléculas demuestra que las moléculas spFv no solo conservan la misma unión y función con propiedades biofísicas mejoradas, sino que también mejoran significativamente la calidad de la proteína y la agregación de terapias observadas en scFv.

El spFv consiste en un enlazador que tiene un motivo central 'C1PPC2' (sec. con núm. de ident.: 323) en el que C1 forma un enlace disulfuro con (en el caso del spFv en la orientación 'ligeramente pesada') una cisteína diseñada en la posición 42 (numeración de Chothia) en el dominio VL y C2 forma un enlace disulfuro con una cisteína diseñada en la posición 105 en el dominio VH. HC1 presenta la mutación 'botón' T366W. HC2 presenta la región Fab anti-ENPP3 y las mutaciones 'ojal' T366S, L368A e Y407V.

El BsAb se desarrolló para evaluar el potencial terapéutico de ENPP3 de direccionamiento para la redirección de las células T. NPP3B815 se desarrolló para el tratamiento de tumores sólidos avanzados en los que se sabe que ENPP3 se expresa altamente en la superficie celular.

NPP3B815 se generó mediante la coexpresión de la HC anti-CD3ε spFv 'botón' con la Fab HC anti-ENPP3 que contiene el 'ojal' y emparejada con la cadena ligera (LC). La región variable anti-CD3ε se derivó de Cris7, se identificó en ratones de tipo silvestre y se humanizó en formato scFv para identificar variantes humanizadas con mayor estabilidad térmica que el Cris7 parental en formato scFv con una variedad de afinidades por CD3ε. Brevemente, las regiones de la región determinante de la complementariedad (CDR) murinas se injertaron en las líneas germinales humanas IGHV1-69*02-IGHJ1-01 e IGKV3-11*02-IGKJ4-01 seguidas de una adaptación del marco humano como se describió

anteriormente. La HC parental contenía una secuencia NG en CDR3 en las posiciones de aminoácidos 106-107 (posiciones 100B-100C en la numeración de Kabat), lo que representa un riesgo potencial. Este riesgo fue eliminado por la mutación N106A. Aunque varias mutaciones podrían eliminar este riesgo, se seleccionó N106A basado en una afinidad más débil de la variante N106A en comparación con la región v parental, ya que una afinidad más débil hacia CD3ε puede estar asociada con una menor toxicidad. Después, la región v anti-CD3 se formateó en un spFv en la molécula final NPP3B815. La región variable anti-ENPP3 se descubrió inmunizando ratones transgénicos (Ablexis) con un plásmido que expresa ENPP3 de longitud completa (ID de lote de ADN Genedata VB000066101). La región variable anti-ENPP3 parental, presentada en el mAb NPP3B56, no se modificó y se formateó como un Fab en la molécula final NPP3B815.

7.3.1 Propiedades de diseño intrínsecas de anticuerpos biespecíficos de ENPP3xCD3 seleccionados

NPP3B815 exhibió, entre otras características, un perfil biofísico favorable con alta afinidad (es decir, 920 pM) por la ENPP3 humana y baja afinidad (es decir, 110 nM) por la CD3 humana, alta pureza, buena estabilidad conformacional, baja hidrofobicidad y sin unión no específica. Además, NPP3B815 exhibió buenos perfiles de estabilidad en suero, en condiciones fisiológicas ex vivo, en estudios de degradación forzada inducida por PTM y bajo estrés térmico en altas concentraciones. En resumen, NPP3B815 exhibió un bajo riesgo de desarrollo con propiedades intrínsecas favorables de capacidad de fabricación.

7.3.2 Selección de líneas celulares cancerosas que expresan ENPP3 para la evaluación de NPP3B815 in vitro e in vivo

La expresión de la superficie de ENPP3 y la densidad del receptor se evaluaron inicialmente en un panel de 13 líneas celulares RCC y HCC establecidas in vitro mediante citometría de flujo usando un anticuerpo ENPP3 comercial (clon NP4D6) que se une a un epítopo similar al brazo aglutinante de ENPP3 dentro de NPP3B815. Como se representa en la **Figura 18**, la expresión endógena de ENPP3 osciló entre negativa (determinada como < límite inferior de detección [LLOD], 2969 receptores/célula) en las líneas celulares Caki1, HEK293T y RXF393 (PDX), baja (<15000 receptores/célula) en 786-O, ACHN, Huh7 y Hep3B, media (15.000-40.000 receptores/célula) en KMRC20, HepG2 y VMRCRCW, media-alta (50.000-100.000 receptores/célula) en TUHR4TKB y TUHR10TKB y alta (>100.000 receptores/célula) en líneas celulares A704. El ENPP3 endógeno se inactivó (usando repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas [CRISPR]) en la línea celular HepG2, generando así la línea celular negativa HepG2 ENPP3-KO. Por el contrario, ENPP3 se sobreexpresó en la línea celular CHO-K1 para generar la línea celular de sobreexpresión CHO-K1 ENPP3OE.

Para confirmar si NPP3B815 detectó una expresión similar de ENPP3 en estas líneas celulares, se usó ENPP3xNull BsAb NPP3B812 marcado directamente, que tiene el mismo aglutinante de ENPP3 NPP3B56 que NPP3B815, para estudios de densidad de receptores basados en citometría de flujo. Se observó que el nivel de expresión de ENPP3 con NPP3B812 era comparable al observado con el anticuerpo comercial en las líneas celulares analizadas. Si bien estas líneas celulares representan un rango de expresión de ENPP3, la mayoría de ellas tienen una expresión más baja que los tumores ccRCC. Entre

estas líneas celulares, se usaron líneas celulares A704, VMRCRCW y HepG2 ENPP3-KO para la mayoría de los estudios funcionales in vitro clave, ya que representan niveles de expresión de ENPP3 altos, medios y negativos, respectivamente.

Dos de estas líneas celulares (es decir, VMRCRCW y HepG2) también se han establecido como modelos CDX in vivo para usar en estudios de eficacia de NPP3B815. La expresión de ENPP3 ex vivo se midió mediante IHC y citometría de flujo (tumores disociados) en un volumen de tumor equivalente al tumor en el momento de la aleatorización en estos 2 modelos de tumores CDX. La IHC mostró positividad para ENPP3 en ambos tumores CDX y se encontró que la densidad de receptores era de 10.600 (VMRCRCW) y 22.000 (HepG2) receptores ENPP3 por célula (**Figura** 19). Para explorar un modelo tumoral que exprese ENPP3 superior para estudios in vivo, se identificaron varios modelos ccRCC PDX positivos mediante IHC; La expresión de ENPP3 se evaluó ex vivo en el modelo RXF488 de ccRCC PDX, que mostró una alta expresión de ENPP3 mediante IHC y mediciones de densidad de receptores de 130.000 receptores/célula.

7.3.3 Unión in vitro de NPP3B815 a células tumorales y células T

La unión celular in vitro de NPP3B815 (NPP3B56xCD3B2030-N106A) se evaluó en líneas celulares que expresan ENPP3 endógeno alto (A704), medio (VMRCRCW) y negativo (**Tabla 18**). NPP3B815 exhibió una unión dependiente de la dosis a ambas líneas celulares positivas, A704 y VMRCRCW, con valores de EC50 de 1,01 nM y 0,5 nM respectivamente (¡Error! Fuente de referencia no encontrada. ¡Error! No se encontró la fuente de referencia. y **la Tabla 19**). NPP3B815 no mostró unión a la línea

celular ENPP3 negativa HepG2 ENPP3-KO. No se observó unión a ninguna de las líneas celulares con los anticuerpos NullxCD3 (79C3B615) o de control de isotipo (79C3B613).

Tabla 18: Expresión de ENPP3 (densidad de receptores) en diferentes líneas celulares cancerosas

Células tumorales	Densidad del receptor (ABC)
A704	161.000
TUHR10TKB	89.000
TUHR10TKB	61.000
VMRCRCW	31.000
HepG2	26.000
HepG2 ENPP3 KO	Negativo

Además, se evaluó la unión de NPP3B815 a células T humanas aisladas de 6 donantes sanos diferentes. Se observó una unión dependiente de la dosis a células T de los 6 donantes, con una EC50 promedio (± error estándar de la media) de 177 ± 18,5 nM (**Figura 20** y **Tabla 19**). Como se esperaba, no se observó unión con el anticuerpo de control de isotipo 79C3B613 a ninguno de los donantes de células T.

Para evaluar la especificidad de NPP3B815 para ENPP3 en comparación con otros miembros de la familia ENPP, se evaluó la unión celular en células CHOK1 que sobreexpresan ENPP1, ENPP2 o ENPP3 (**Figura** 21). NPP3B815 exhibió una unión dependiente de la dosis solo a las células CHOK1 que sobreexpresan ENPP3, con una afinidad de unión (EC50) de 0,5 nM. NPP3B815 no mostró ninguna unión a la línea celular CHOK1 parental negativa a ENPP3 o a las células CHOK1 que sobreexpresan ENPP1 o ENPP2 (**Figura 21** y **Tabla 19**). No se observó unión a ninguna de las líneas celulares con el anticuerpo de control de isotipo (79C3B613).

Tabla 19: Valores de EC50 de unión celular para NPP3B815 en células diana y células T.

	EC_{50} (nM)
Células diana	
A704	1,01
VMRCRCW	0,5
HepG2 ENPP3 KO	ND
CHO parental	ND
CHO ENPP1 OE	ND
CHO ENPP2 OE	ND
CHO ENPP3 OE	0,51
Células T	
888668965	197,3
110048457	132
110044049	188,5
110042593	145,6
110042496	147,2
110040278	253,3

ECx, x % concentración efectiva; ND, No determinado

Los valores de EC50 no se determinaron si la curva dosis-respuesta no cumplía uno o ambos de los siguientes criterios: R2 debe ser >0,9 y la diferencia logarítmica (intervalo de confianza del 95 %) debe ser <1,2.

7.3.4 Citotoxicidad inducida por NPP3B815 y activación de células T en un panel de líneas celulares cancerosas con diferentes niveles de expresión endógena de ENPP3

La capacidad de NPP3B815 (NPP3B56xCD4B2030) para inducir la destrucción de células tumorales mediada por células T se evaluó usando un instrumento Incucyte (lapso de tiempo de células vivas) contra un panel de líneas celulares cancerosas (Tabla 20) con diferentes niveles de expresión de ENPP3: alto (A704), medio-alto (TUHR10TKB, TUHR4TKB), medio (VMRCRCW, HepG2) y negativo (HepG2 ENPP3-KO). La citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis inducida por NPP3B815 en

una relación de célula efectora a célula diana (E:T) de 3:1 en todas las líneas celulares positivas a ENPP3 (A704, VMRCRCW, HepG2, TUHR4TKB y TUHR10TKB), mientras que no se observó muerte contra la línea celular negativa (HepG2 ENPP3-KO) (**Figura 22**). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con los anticuerpos de control NullxCD3 (79C3B615) o ENPP3xNull (NPP3B812) en ninguna de las líneas celulares analizadas. Los valores de EC50 y de actividad máxima para la destrucción de células tumorales se muestran en la Tabla 20, ya que las líneas celulares con mayor expresión de ENPP3 tenían valores de EC50 más bajos con una destrucción máxima de células tumorales alta.

Para evaluar el nivel de activación de células T inducida por el anticuerpo biespecífico ENPP3xCD3, se midió la expresión de CD25 en células T mediante citometría de flujo 48 horas después del tratamiento con anticuerpo (**Figura 23**). Se observó un aumento dependiente de la dosis en la activación de las células T (relación E:T = 3:1) con NPP3B815 en todas las líneas celulares positivas a ENPP3 analizadas (A704, VMRCRCW y HepG2, mientras que no se observó activación de células T con NPP3B815 en la línea celular negativa (ENPP3-KO de HepG2) o con los anticuerpos control NullxCD3 y ENPP3xNull en cualquiera de las líneas celulares analizadas. La EC50 y los valores de actividad máxima para la activación de células T se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: EC50 y valores máximos de actividad para la destrucción de células tumorales y la activación de células T en un panel de líneas de células tumorales con expresión endógena de ENPP3.

Línea celular	Destrucción de células tumorales (Incucyte)			Activación de células T (citometría de flujo)		
	EC_{50} (nM)	EC_{90} (nM)	Destrucción máx. (%)	EC_{50} (nM)	EC_{90} (nM)	Destrucción máx. (%)

A704	0,03	0,08	82	0,011	0,042	90
TUHR10TKB	0,02	0,06	88	-	-	-
TUHR4TKB	0,05	0,09	80	-	-	-
VMRCRCW	0,13	0,65	63	0,018	0,085	93
HepG2	0,53	3,68	68	0,041	0,175	93
HepG2 ENPP3-KO	ND	ND	ND	0,842	3,834	20

ECx, x % concentración efectiva; Máx., máximo; ND, No determinado

Los valores de EC50, EC90 y destrucción máxima no se determinaron si la curva dosis-respuesta no cumplía uno o ambos de los siguientes criterios: R2 debe ser >0,9 y la diferencia logarítmica (intervalo de confianza del 95 %) debe ser <1,2.

[ELN E066020, E069414, E063183, E063179]

7.3.5 Citotoxicidad inducida por NPP3B815 y activación de células T en múltiples donantes de células T y relaciones E:T

La destrucción de células tumorales mediada por células T inducida por NPP3B815 de las líneas celulares A704 positivas para ENPP3 (alta) y VMRCRCW (mediana) y de la línea celular HepG2 negativa para ENPP3 se evaluó ENPP3-KO en presencia de células T aisladas de 6 donantes humanos sanos diferentes (probados a una relación E:T = 3:1) (**Figura** 24A). Se observó citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis con NPP3B815 en los 6 donantes, observándose cierta variabilidad en los valores de EC50 y destrucción celular máxima entre los diferentes donantes (Tabla 21). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con el anticuerpo de control NullxCD3 79C3B615 contra todas las líneas celulares y donantes de células T analizados. Al igual que A704, se observó citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis con NPP3B815 en todos los donantes de la línea celular de ENPP3-media, VMRCRCW, mientras que no se observó destrucción contra la línea celular negativa (HepG2 ENPP3-KO). La EC50 y los valores máximos de destrucción se muestran en la Tabla 21.

Además de la evaluación de citotoxicidad descrita anteriormente, se evaluó la activación de células T inducida por NPP3B815 (expresión de CD25 mediante citometría de flujo a las 48 horas) con los mismos 6 donantes de células T en una relación E:T de 3:1 (**Figura** 24B). Se observó un aumento dependiente de la dosis en la activación de células T con NPP3B815 en los 6 donantes de células T en ambas líneas celulares positivas a ENPP3 (A704 y VMRCRCW). No se observó activación de células T con NPP3B815 en la línea celular negativa (HepG2 ENPP3-KO) o con el anticuerpo de control NullxCD3 79C3B615 contra todas las líneas celulares analizadas. Los valores de EC50 y máximos para la activación de célula T en la Tabla 22.

La citotoxicidad inducida por NPP3B815 también se evaluó en relaciones E:T más bajas y fisiológicamente más relevantes de 1:1 y 1:3, y se observó una destrucción dependiente de la dosis en la línea celular de ENPP3 alta, A704, en estas relaciones E:T (**Figura** 25). Se observó una modesta disminución en la actividad de destrucción máxima de NPP3B815 en las relaciones E:T más bajas de 1:1 (41 %) y 1:3 (17 %), en comparación con la observada en la línea celular A704 de ENPP3 alta en una relación E:T de 3:1 (71 %), cuando se mide a las 72 horas (Tabla 21). NPP3B815 Curiosamente, con un tiempo de incubación más prolongado (5 días frente a 3 días), la destrucción máxima en A704 en las relaciones E:T más bajas de 1:3 aumentó de 41 % al 91 % para E:T = 1:1 y de 17 % al 65 % 35 % para E:T = 1:3, lo que lleva a una destrucción máxima similar a la de relaciones E:T más altas. También se realizaron ensayos de citotoxicidad similares en relaciones E:T más bajas en la línea celular de ENPP3-media VMRCRCW y la línea celular negativa, HepG2 ENPP3-KO. Se observó una destrucción dependiente de la dosis en VMRCRCW en las relaciones E:T más bajas, mientras que no se observó

ninguna destrucción contra la línea celular negativa HepG2 ENPP3-KO (**Figura** 25). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con el anticuerpo de control NullxCD3 79C3B615 en ninguna de las relaciones E:T o líneas celulares analizadas. La EC50 y los valores de actividad máxima para la destrucción de células tumorales se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21: Valores de EC50 para la citotoxicidad de células tumorales en donantes de células T y relaciones E:T.

Donantes de células T	E:T = 3:1		E:T = 1:1				E:T = 1:3			
	EC_{50} (nM) a las 72hr	Destrucción máxima (%) a las 72hr	EC_{50} (nM) a las 72hr	Destrucción máxima (%) a las 72hr	EC_{50} (nM) a las 120hr	Destrucción máxima (%) a las 120hr	EC_{50} (nM) a las 72hr	Destrucción máxima (%) a las 72hr	EC_{50} (nM) a las 120hr	Destrucción máxima (%) a las 120hr
A704										
888668965	0,04545	83	ND	48	ND	93	ND	16	0,163	79
110048457	ND	63	ND	33	ND	92	ND	ND	ND	64
110044049	0,05244	76	ND	27	0,125	94	ND	10	ND	54
110042593	0,03358	74	0,114	57	0,048	94	ND	29	0,106	71
110042496	0,06961	79	0,132	30	0,073	80	ND	11	0,191	55
110040278	0,04837	53	0,075	50	0,041	92	ND	19	0,149	64
VMRCRCW										
888668965	0,1561	58	0,273	35	0,345	59	0,469	18	0,379	32
110048457	0,3716	35	0,177	48	0,21	66	0,276	29	0,267	43
110044049	0,1148	65	0,151	54	0,216	66	0,226	29	0,337	39
110042593	0,07951	79	0,225	53	0,218	68	ND	ND	0,485	43
110042496	0,1278	50	0,465	33	0,454	44	ND	ND	0,5	20
110040278	0,09229	40	0,243	41	0,264	53	0,456	24	0,332	31
HepG2 ENPP3-KO										
888668965	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
110048457	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
110044049	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
110042593	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
110042496	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
110040278	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

EC_x, x % de concentración efectiva; Máx., máximo; ND, No determinado

Los valores EC_{50} y destrucción máxima no se determinaron si la curva dosis-respuesta no cumplía uno o ambos de los siguientes criterios: R^2 tiene que ser >0,9 y la diferencia logarítmica (intervalo de confianza del 95 %) debe ser <1,2.

Tabla 22: Valores de EC50 para la activación de células T entre donantes (relación E:T = 3:1).

Donantes de células T	A704		VMRCRCW		HepG2 ENPP3-KO	
	EC_{50} (nM)	Actividad máxima (%)	EC_{50} (nM)	Actividad máxima (%)	EC_{50} (nM)	Actividad máxima (%)
888668965	0,008	91	0,016	92	ND	ND
110048457	0,01	89	0,009	93	1,142	9,414
110044049	0,008	86	0,009	80	ND	ND
110042593	0,013	90	0,017	86	ND	ND
110042496	0,017	85	0,015	85	ND	ND
110040278	0,008	88	0,007	86	ND	ND

Los valores de EC_{50} y actividad máxima no se determinaron si la curva dosis-respuesta no cumplía uno o ambos de los siguientes criterios: R^2 tiene que ser >0,9 y la diferencia logarítmica (intervalo de confianza del 95 %) debe ser <1,2.

7.3.6 Liberación de citoquinas inducida por NPP3B815 en presencia de células T y células tumorales

Para caracterizar aún más la activación de las células T por NPP3B815, se midieron los perfiles de liberación de citoquinas de 10 citoquinas inflamatorias establecidas usando el panel proinflamatorio Vplex humano (Meso Scale Discovery [MSD]) en la línea celular A704 de ENPP3-alto a las 48 horas después de la incubación con células T de 6 donantes humanos sanos diferentes en una relación E:T de 3:1. Se observó un aumento dependiente de la dosis en todas las citoquinas proinflamatorias analizadas con NPP3B815 en los 6 donantes de células T, observándose cierta variabilidad en la respuesta entre los donantes (**Figura 26**). Algunas citoquinas como el interferón (IFN)-γ, la interleucina (IL)-2, la IL-10, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)-α exhibieron una fuerte inducción dependiente de la dosis con el tratamiento con NPP3B815 (**Figura 26** y Tabla 23), mientras que otros (IL-1β, IL-12p70, IL-4, IL-13, IL-

8) tuvieron una inducción dependiente de la dosis moderada a baja. Las concentraciones de citoquinas inducidas varían ampliamente con el tratamiento con NPP3B815, desde la citocina inducida más baja (IL-1β) en pg/ml de un solo dígito hasta la más alta (IFN-γ) en el rango de ng/ml de 3 dígitos. El anticuerpo de control NullxCD3 79C3B615 indujo una respuesta baja o nula de citoquinas como se esperaba, excepto en el caso de IL-8, que mostró una señal de fondo alta.

Tabla 23: Valores de EC50 para la liberación de citoquinas con donantes de células T.

Donantes de células T	IFN-g	IL-10	IL-2	TNF-a	IL-6
888668965	0,122	0,085	0,268	0,143	0,041
110048457	0,117	0,156	0,390	0,124	0,037
110044049	0,240	0,210	0,395	0,241	0,782
110042593	0,198	0,151	0,295	0,087	0,047
110042496	0,264	0,177	0,305	0,112	0,036
110040278	0,078	0,084	0,211	0,059	0,029

ECx, x % concentración efectiva; Máx., máximo; ND, no determinado; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; Los valores de EC50, EC90 y destrucción máxima no se determinaron si la curva dosis-respuesta no cumplía uno o ambos de los siguientes criterios: R2 debe ser >0,9 y la diferencia logarítmica (intervalo de confianza del 95 %) debe ser <1,2.

7.3.7 Citotoxicidad inducida por NPP3B815 de donantes de PBMC

La destrucción de células tumorales inducida por NPP3B815 se evaluó en presencia de PBMC aisladas de los 6 donantes correspondientes de los cuales se aislaron previamente células T humanas. Se observó citotoxicidad dependiente de la dosis con el tratamiento con NPP3B815 en presencia de todos los 6 donantes de PBMC en la línea celular A704 de ENPP3-alto en una relación E:T de 5:1 (**Figura** 27). También se observó citotoxicidad dependiente de la dosis con el tratamiento con NPP3B815 en presencia de

todos los 6 donantes de PBMC en la línea celular de ENPP3-medio VMRCRCW, mientras que no se observó destrucción contra la línea celular negativa HepG2 ENPP3-KO.

Además, la citotoxicidad inducida por NPP3B815 en presencia de PBMC también se evaluó en relaciones E:T más bajas y fisiológicamente más relevantes de 3:1 y 1:1. Se observó una destrucción dependiente de la dosis de la línea celular A704 positiva para ENPP3 en las relaciones E:T más bajas en presencia de todos los 6 donantes de PBMC (**Figura** 27). Se observó una disminución moderada en la actividad de destrucción máxima de NPP3B815 con la relación E:T más baja de 1:1 (44 %), en comparación con la observada con una relación E:T de 5:1 (82 %) y 3:1 (78 %). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales con el anticuerpo de control NullxCD3 79C3B615 en presencia de ninguno de los donantes de PBMC y líneas celulares analizadas (**Figura** 27). La EC50 y los valores máximos de destrucción se muestran en ¡**Error! Fuente de referencia no encontrada.**

Tabla 24: Valores de EC50 para citotoxicidad de células tumorales con donantes de PBMC.

Donantes de células T	E:T = 5:1		E:T = 3:1		E:T = 1:1	
	EC_{50} (nM)	Destrucción máx. (%)	EC_{50} (nM)	Destrucción máx. (%)	EC_{50} (nM)	Destrucción máx. (%)
A704						
888668965	0,015	92	0,036	95	0,107	73
110048457	0,013	78	0,046	76	ND	26
110044049	0,016	89	0,052	79	0,131	52
110042593	0,015	83	0,039	80	0,124	47
110042496	0,061	60	0,097	64	ND	25
110040278	0,028	89	0,052	75	ND	37
VMRCRCW						
888668965	0,062	73	-	-	-	-

110048457	0,063	69	-	-	-	-
110044049	0,051	70	-	-	-	-
110042593	0,033	73	-	-	-	-
110042496	0,065	52	-	-	-	-
110040278	0,033	64	-	-	-	-
HepG2 ENPP3 KO						
888668965	ND	ND	-	-	-	-
110048457	ND	ND	-	-	-	-
110044049	ND	ND	-	-	-	-
110042593	ND	ND	-	-	-	-
110042496	ND	ND	-	-	-	-
110040278	ND	ND	-	-	-	-

EC_x, x % de concentración efectiva; Máx., máximo; ND, no determinado; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; Los valores de EC_{50}, EC_{90} y destrucción máxima no se determinaron si la curva dosis-respuesta no cumplía uno o ambos de los siguientes criterios: R^2 tiene que ser >0,9 y la diferencia logarítmica (intervalo de confianza del 95 %) debe ser <1,2.

7.3.8 Unión celular y citotoxicidad con células que expresan ENPP3 de cyno.

El brazo de unión a ENPP3 de NPP3B815 tiene reacción cruzada en el mono cynomolgus, pero su brazo de unión a CD3 es específico para humanos. Por lo tanto, se generó una molécula herramienta (es decir, NPP3B847) que contenía el mismo brazo de unión a ENPP3 que NPP3B815 pero que incluía un brazo de unión a CD3 con reacción cruzada de cynomolgus, CD3B219 (sin engrapar, scFv). La unión celular in vitro de la molécula herramienta NPP3B847 se evaluó en células T humanas y de cynomolgus, así como en una línea celular ENPP3 de cynomolgus, HepG2-KO cyENPP3 OE. NPP3B847 exhibió una unión dependiente de la dosis a la línea celular que sobreexpresa ENPP3 de cynomolgus HepG2-KO cyENPP3 OE con un valor de EC50 de 1,6 nM, sin que se observe unión con el anticuerpo de control de isotipo (79C3B613) (**Figura** 28A y Tabla 25). Además, se observó una unión dependiente de la dosis comparable de NPP3B847

con células T tanto humanas como de mono cynomolgus, los valores de afinidad de unión (EC50) son 4,5 nM y 5,2 nM, respectivamente (**Figura** 28B y Tabla 25).

Tabla 25: Resumen de las características moleculares de NPP3B815 y NPP3B847

	Especies	**Molécula de herramienta NPP3B847**
Aglutinante de CD3		CD3B219
Ensayo de ENPP3 (basado en células)	PNH	1,6 nm
Unión de CD3 (basada en células)	Humano	4,5 nM
	PNH	5,2 nm

Se realizó una evaluación de la actividad funcional in vitro de la molécula herramienta NPP3B847 mediante la evaluación de la activación de células T y la citotoxicidad de células tumorales mediada por células T en presencia de células T humanas o de mono cynomolgus. Estas lecturas se midieron mediante citometría de flujo en células HepG2 ENPP3-KO que sobreexpresan ENPP3 de cynomolgus (**Figura** 29 y Tabla 26) y se compararon con la actividad del candidato clínico NPP3B815 en presencia de células T humanas.

La destrucción celular mediada por células T inducida por NPP3B847 de la línea celular ENPP3-OE de cyno HepG3-KO se evaluó en presencia de células T de cynomolgus aisladas de 4 donantes diferentes (probadas con una relación E:T = 3:1) (**Figura** 29). Se observó citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis con NPP3B847 en todos los 4 donantes, con cierta variabilidad observada en los valores de EC50 (0,05 nM - 0,14 nM) entre los diferentes donantes (Tabla 26). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con el anticuerpo NPP3B41 de control NullxCD3 con donantes de células T de

cynomolgus analizados. Además, la destrucción celular mediada por células T inducida por NPP3B847 de la línea celular ENPP3-OE de cynomolgus HepG2-KO se comparó con la de NPP3B815 usando células T humanas como células efectoras en una relación E:T = 3:1 (**Figura** 31). Se observó citotoxicidad mediada por células T dependiente de la dosis tanto con NPP3B847 como con NPP3B815 a valores de EC50 de 0,016 nM y 0,079 nM respectivamente, sin que se observara destrucción con el anticuerpo NPP3B41 de control NullxCD3 con células T humanas (Tabla 26).

Además de evaluar la citotoxicidad, se evaluó la activación de células T inducida por NPP3B847 (expresión de CD25 mediante citometría de flujo a las 48 horas) con los mismos 4 donantes de células T de cynomolgus en una relación E:T de 3:1 (**Figura** 29). Se observó un aumento dependiente de la dosis en la activación de células T (EC50 = 0,005 nM – 0,033 nM) con NPP3B847 en todos los 4 donantes de células T analizados en la línea celular ENPP3-OE de cynomolgus HepG3-KO y no se observó actividad con el anticuerpo NPP3B41 de control NullxCD3. Además, se evaluó la activación de células T humanas tanto con NPP3B847 como con NPP3B815 usando línea celular de ENPP3-OE de cynomolgus HepG2-KO en una relación E:T = 3:1 (**Figura** 29). Se observó activación de células T humanas dependiente de la dosis tanto con NPP3B847 como con NPP3B815 a un valor de EC50 de 0,004 nM y 0,023 nM, respectivamente, sin que se observara activación con el anticuerpo NPP3B41 de control NullxCD3. Los valores de EC50 para la activación de células T de cynomolgus y humanas con NPP3B815 y NPP3B41 se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Resumen de los valores de EC50 de los ensayos de citotoxicidad y activación de células T usando NPP3B815 y NPP3B847.

Molécula	Células T de cynomolgus								Células T humanas	
	EC_{50} de citotoxicidad (nM)				EC_{50} de activación de células T (nM)				Citotoxicidad EC_{50} (nM)	EC_{50} de activación de células T (nM)
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4		
NPP3B847	0,114	0,053	0,1115	0,137	0,033	0,005	0,011	0,008	0,016	0,004
NPP3B815	N/A				N/A				0,079	0,023

cyno, mono cynomolgus; citotox., citotoxicidad; EC50, 50 % de concentración efectiva; N/A, no aplicable.

7.3.9 Eficacia in vivo

La actividad antitumoral de ENPP3xCD3 BsAb engrapado (spFv) NPP3B815 o la versión sin engrapar (scFv) NPP3B194 en comparación con el anticuerpo de control NullxCD3 se evaluó en el modelo VMRCRCW humano RCC CDX de ENPP3 bajo (~10.600 receptores/célula) establecido o el modelo humano HCC HepG2 de ENPP3-medio (~22.000 receptores/célula), respectivamente. Los estudios de eficacia se realizaron en ratones NSG hembra inmunocomprometidos humanizados con células T pan CD3+ de donantes. El tratamiento dos veces por semana con NPP3B815 o NPP3B194 administrado por vía intraperitoneal (IP) se inició después de que se establecieron los tumores SC y 1 día después del injerto de células T IP. El injerto de células T humanos puede conducir a la pérdida de peso corporal debido a la eventual enfermedad de injerto contra huésped (GvHD); sin embargo, el tratamiento con NPP3B815 no resultó en una pérdida significativa de peso corporal en comparación con el grupo de control tratado con NullxCD3. En el modelo de tumor HepG2, se observó pérdida de peso corporal debido a la caquexia inducida por el tumor en todos los grupos.

En el estudio ONC2022-035, los ratones que portan xenoinjertos SC VMRCRCW establecidos se dosificaron vía IP con NPP3B815 dos veces por semana a

10, 1, 0,1, y 0,01 mg/kg, o anticuerpo de control NullxCD3 (10 mg/kg) durante un total de 8 dosis (n=10/grupo). La eficacia antitumoral significativa se observó con el tratamiento con NPP3B815 a 10 y 1 mg/kg a lo largo del tiempo ($p<0,05$) con 70 % y 75 % de Δ inhibición de crecimiento tumoral (TGI) respectivamente, en comparación con los ratones de control tratados con anticuerpo NullxCD3 en el Día 39 después de la implantación del tumor (**Figura ¡Error! Fuente de referencia no encontrada.** A). El tratamiento con NPP3B815 a 0,1 y 0,01 mg/kg dio como resultado un 58 % y 42 % de ΔTGI, respectivamente, en comparación con los animales tratados con anticuerpo NullxCD3 el día 39. Aunque son estadísticamente significativos ($p<0,05$), los datos de estas dosis más bajas de NPP3B815 no son biológicamente significativos (Johnson et al., 2001, Br J Cancer, 84(10):1424-1431). La falta de eficacia biológicamente significativa (es decir, >60 % de TGI) observada en el tratamiento con NPP3B815 a 0,1 y 0,01 mg/kg demostró que 1 mg/kg es la dosis mínimamente eficaz contra el modelo de nivel diana de ENPP3 bajo.

En el Estudio P764Y, los ratones que portan xenoinjertos SC HepG2 establecidos se dosificaron vía IP con NPP3B194 (ScFv versión de NPP3B815) dos veces por semana a 5, 1 y 0,05 mg/kg, o con el anticuerpo de control NullxCD3 durante un total de 6 dosis (n=10/grupo). La eficacia antitumoral significativa se observó con el tratamiento con NPP3B194 a 5 y 1 mg/kg a lo largo del tiempo ($p<0,05$) con 90 % y 104 % de ΔTGI respectivamente, en comparación con los ratones de control tratados con el anticuerpo NullxCD3 en el Día 52 después de la implantación del tumor (**Figura** 31). El tratamiento con NPP3B194 a 0,05 mg/kg no fue estadísticamente significativo en comparación con los animales tratados con anticuerpo NullxCD3 el día 52. El tratamiento con NPP3B194 a 5 y 1 mg/kg dio como resultado 2 de 8 y 7 de 9

regresiones tumorales completas en el último día del estudio (día 61), respectivamente. Todos los resultados de eficacia se resumen en la Tabla 27.

Tabla 27: Síntesis de resultados de eficacia para NPP3B815 o NPP3B194.

Tipo de estudio [referencia]	Especie/sistema de prueba	Duración del tratamiento	Animales por grupo (M/F)	Grupos de dosis y resultados clave
VMRCRCW SC establecido [Estudio ONC2022-035]	Ratones NSG/donante de células T D204071 Lote 19055100, HemaCare	4 semanas (**NPP3B815**)	10 (F)	42 % ΔTGI a 0,01 mg/kg; 58 % ΔTGI a 0,1 mg/kg; 75 % ΔTGI a 1 mg/kg; 70 % ΔTGI a 10 mg/kg; q3d-q4d IP para 8 dosis
HepG2 SC establecido [Estudio P764Y]	Ratones NSG/donante de células T D204071 Lote 19057273, HemaCare	3 semanas (NPP3B194)	10 (F)	104 % ΔTGI a 1 mg/kg, 7 de 9 CR; 90 % ΔTGI a 5 mg/kg, 2 de 8 CR; 38 % ΔTGI a 0,05 mg/kg (ns); q3d-q4d IP para 6 dosis

CR, respuesta completa; F, femenino; IP, intraperitoneal; M, masculino; NSG, gamma con inmunodeficiencia combinada severa (scid, por sus siglas en inglés) diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) o NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ; q3d-q4d, dos veces por semana; SC, subcutáneo; TGI: inhibición del crecimiento tumoral.
p≤0,05 frente al control excepto donde se indique como no significativo (ns).

A continuación, se evaluó el efecto de NPP3B815 sobre el crecimiento de xenoinjertos establecidos con HepG2 en ratones humanizados con células T (Estudio P903S). El modelo HepG2 expresa niveles diana de ENPP3 relativamente bajos. Los ratones se aleatorizaron en grupos de 12 animales cada uno, 21 días después de la implantación del tumor HCC HepG2 humano según el volumen del tumor, de tal manera que todos los grupos tuvieran valores medios de 114 mm^3. Los ratones enrolados en el estudio fueron humanizados con células T el día de la aleatorización y el tratamiento con NullxCD3 a 5 mg/kg o NPP3B815 a 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 mg/kg se administró IP al día siguiente (día 22) y dos veces por semana a partir de entonces para un total de 8 dosis.

Los ratones con tumores HCC HepG2 humanos y tratados con NPP3B815 dieron como resultado una protección significativa contra la pérdida de peso corporal en

los grupos tratados con NPP3B815 a 5, 1 y 0,5 mg/kg en comparación con los animales de control NullxCD3 el día 45, cuando al menos 9 de 12 ratones permanecieron por grupo. Las dosis más bajas de NPP3B815 de 0,1 y 0,05 mg/kg no tuvieron pesos corporales significativamente diferentes en comparación con el tratamiento de control NullxCD3 el día 45. Los tumores HepG2 inducen caquexia en animales portadores de tumores y la gravedad es proporcional al tamaño del tumor. El estudio se terminó en el día 65.

En ratones portadores de xenoinjertos HCC HepG2 humanos establecidos, se observó una eficacia antitumoral significativa con el tratamiento con NPP3B815 a 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 mg/kg, lo que dio como resultado 92 %, 94 %, 101 %, 65 % y 34 % ΔTGI, respectivamente, en comparación con los animales tratados con anticuerpo NullxCD3 el día 45 después de la implantación del tumor, cuando a los grupos les quedaban al menos 9 de 12 animales ($p \leq 0,05$, ver **Figura 32**). Si bien es estadísticamente significativo, el tratamiento con NPP3B815 a 0,1 y 0,05 mg/kg no dio como resultado una actividad antitumoral biológicamente significativa (>60 % de TGI) (59 % y 31 % de TGI, respectivamente) en comparación con los animales tratados con el anticuerpo NullxCD3 en el día 45. La falta de eficacia biológicamente significativa observada en el tratamiento con NPP3B815 a 0,1 y 0,05 mg/kg demostró que 0,5 mg/kg es la dosis mínimamente eficaz en el modelo HepG2 de nivel diana bajo de ENPP3. El tratamiento con NPP3B815 a 1 y 0,5 mg/kg dio como resultado 1 CR de 12 ratones los días 49 y 56, respectivamente. En resumen, NPP3B815 a 5, 1 y 0,5 mg/kg inhibió significativamente el crecimiento tumoral, lo que dio como resultado un 92 %, 94 % y 101 % ΔTGI, respectivamente, el día 45, en comparación con los ratones de control NullxCD3 con 1 de 10 respuestas completas (CR) cada uno en los grupos de dosis de 0,5 y 1 mg/kg.

A continuación, se evaluó el efecto de NPP3B815 sobre el crecimiento de xenoinjertos establecidos con RXF 488 en ratones humanizados con células T (estudio P903H2). El modelo de tumor RCC RXF 488 PDX expresa niveles diana de ENPP3 relativamente altos. Los ratones se aleatorizaron en grupos de 12 animales cada uno, 18 días después de la implantación del fragmento tumoral RCC PDX RXF 488 de acuerdo con el volumen del tumor, de tal manera que todos los grupos tuvieran valores medios de 138 mm3. Los ratones enrolados en el estudio fueron humanizados con células T el día de la aleatorización y el tratamiento con NullxCD3 a 5 mg/kg o NPP3B815 a 5, 0,5, 0,05 y 0,005 mg/kg se administró IP al día siguiente (día 19) y dos veces por semana posteriormente hasta un total de 8 dosis.

Los ratones con tumores RCC RXF 488 y tratados con NPP3B815 dieron como resultado una protección significativa contra la pérdida de peso corporal en los grupos tratados con NPP3B815 a 5, 0,5, 0,05 y 0,005 mg/kg en comparación con los animales de control NullxCD3 el día 42, cuando al menos 7 de 12 los ratones permanecieron por grupo. Los tumores RCC RXF 488 inducen caquexia en animales portadores de tumores y la gravedad fue proporcional al tamaño del tumor. El estudio se terminó en el día 60.

En ratones portadores de tumores SC RCC RXF 488 PDX, se observó una eficacia antitumoral significativa con el tratamiento con NPP3B815 a 5, 0,5, 0,05 y 0,005 mg/kg, lo que resultó en 117 %, 116 %, 117 % y 100 % de ΔTGI, respectivamente, en comparación con los animales tratados con anticuerpo NullxCD3 el día 42 después de la implantación del tumor, cuando a los grupos les quedaban al menos 7 de 12 animales ($p \leq 0,05$, ver **Figura 33**). El tratamiento con NPP3B815 a 5, 0,5, 0,05 y 0,005 mg/kg dio con resultado 72 %, 89 %, 74 % ($p \leq 0,05$) y 2 % (no

significativo) de respuesta al tratamiento (TR) y 7, 6, 8 y 4 de 12 respuestas completas (CR), respectivamente, el día 60. Por tanto, todos los niveles de dosis hasta 0,005 mg/kg fueron altamente eficaces en el modelo de tumor RXF 488 PDX superior.