

AGENTES DE UNIÓN AL ANTÍGENO CD3 ESTABILIZADOS Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/518.049, presentada el 7 de agosto de 2023, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 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 JBI6831WOPCT1_SL.xml y su tamaño es de 161 kilobytes.

CAMPO TÉCNICO

15 La descripción proporcionada en la presente se relaciona con el fragmento de unión al antígeno del anti-grupo de diferenciación 3 (CD3) engrapado, capaces de unirse específicamente a CD3 humano y no humano, y particularmente a anticuerpos biespecíficos que comprenden fragmentos de unión al antígeno anti-CD3
20 engrapados que tienen reactividad cruzada con CD3 de un segundo antígeno diana. La descripción también concierne los usos de tales anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

ANTECEDENTES

Los anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpo se han analizado como un medio para reclutar células T citolíticas para destruir células tumorales. Sin embargo, el uso clínico de muchos anticuerpos biespecíficos de reclutamiento de células T se ha visto limitado por desafíos que incluyen la farmacocinética desfavorable, inmunogenicidad potencial, y problemas de fabricación. Por lo tanto, existe una necesidad considerable de anticuerpos biespecíficos que recluten células T citolíticas para destruir células tumorales que exhiben toxicidad reducida y perfiles de fabricación favorables.

El complejo proteico del receptor de antígeno de células T de CD3 humano está compuesto por seis cadenas distintas: una cadena CD3 γ (SwissProt P09693), una cadena CD3 δ (SwissProt P04234), dos cadenas CD3 ϵ (SwissProt P07766), y un homodímero de cadena CD3 ζ (SwissProt P20963) (ϵ γ : δ : ζ ζ), que está asociada con la cadena α y β del 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.

Los fragmentos variables de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés) de unión al antígeno son módulos que pueden usarse ampliamente como terapéuticos, agentes de imágenes, agentes diagnósticos o como porciones de moléculas heterólogas tales como moléculas multiespecíficas. Uno de los desafíos de los scFv es la poca estabilidad y las tendencias a añadirse (revisado en Worn y Pluckthun (2001) J Mol Biol 305: 989-1010; Rothlisberger et al., (2005) J Mol Biol 347: 773-789; Gross et

al., (1989) Transplant Proc 21(1 Pt 1): 127-130, Porter et al., (2011) J Cancer 2: 331-332; Porter et al.,(2011) N Engl J Med 365: 725-733). Por lo tanto, existe una necesidad de diseños de scFv mejorados que opcionalmente puedan incorporarse en moléculas multiespecíficas y moléculas heterólogas.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, se proporciona en la presente un agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3ε (CD3ε), en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende un
 10 scFv engrapado (spFv) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena ligera variable (VL) específica para unirse a CD3ε y una secuencia de enlazador entre el VH y VL, en donde el enlazador comprende al menos un residuo de cisteína (Cys) que sirve como punto de anclaje.

En algunas modalidades, el spFv comprende un enlace disulfuro entre un
 15 residuo de cisteína expuesto a la superficie en al menos uno de los VH y VL, el punto de anclaje del enlazador.

En algunas modalidades, el spFv comprende dos enlaces disulfuro, en donde los primeros enlaces disulfuro se forman entre un residuo de cisteína expuesto a la superficie en la VH y un primer punto de anclaje del enlazador, y los segundos enlaces
 20 disulfuro forman entre un residuo de cisteína expuesto a la superficie en la VL un segundo punto de anclaje del enlazador.

En algunas modalidades, el spFv está en la orientación VH-Enlazador-VL.

En algunas modalidades, el spFv está en la orientación VL-Enlazador-VH.

En ciertas modalidades específicas, el enlazador se selecciona del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.:2, la sec. con núm. de ident.:3, la sec. con núm. de ident.:4, la sec. con núm. de ident.:5 y la sec. con núm. de ident.:6.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno que se une a CD3ε
5 comprende la HCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 7, la HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 8, la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 9, la LCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 10, la LCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 11 y la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno que se une a CD3ε
10 comprende la HCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 13, la HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 14, la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 9, la LCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 10, la LCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 11 y la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno que se une a CD3ε
15 comprende la HCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 15, la HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 16, la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 9, la LCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 10, la LCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 11 y la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno que se une a CD3ε
20 comprende la HCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 17, la HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 18, la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 19, la LCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 20, la LCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 21 y la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 22.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende la HCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 23, la HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 24, la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 25, la LCDR1 de la sec. con núm. de ident.: 26, la LCDR2 de DSS y la LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 12.

- 5 En algunas modalidades, la región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende un dominio de VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:28, y un dominio de VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:29.

En algunas modalidades, la región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende una spFv como se establece en la sec. con núm. de ident.: 30.

- 10 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.

- 15 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, al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en L234A/L235A/D265S, F234A/L235A, L234A/L235A, V234A/G237A/

- 20 P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-
eliminada/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-

eliminada/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, 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.

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 CD3 ϵ .

En algunas modalidades, el segundo antígeno es un antígeno tumoral.

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición que comprende el agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3 ϵ (CD3 ϵ), en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende un scFv engrapado (spFv) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena ligera variable (VL) específica para unirse a CD3 ϵ y una secuencia de enlazador entre VH y VL, en donde el enlazador comprende al menos un residuo de cisteína (Cys) que sirve como punto de anclaje, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona en la presente un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una VH, una VL, o tanto una VH como una VL del agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3ε (CD3ε), en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende un scFv engrapado (spFv) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena ligera variable (VL) específico para la unión a CD3ε y una secuencia de enlazador entre VH y VL, en donde el enlazador comprende al menos un residuo de cisteína (Cys) que sirve como un punto de anclaje y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona en la presente un vector que comprende un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una VH, una VL, o tanto una VH como una VL del agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3ε (CD3ε), en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende un scFv engrapado (spFv) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena ligera variable (VL) específica para la unión a CD3ε y una secuencia de enlazador entre VH y VL, en donde el enlazador comprende al menos un residuo de cisteína (Cys) que sirve como punto de anclaje y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un polinucleótido que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una VH, una VL, o tanto una VH como una VL del agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3ε (CD3ε), en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende un scFv engrapado (spFv) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena

ligera variable (VL) específica para la unión a CD3 ϵ y una secuencia de enlazador entre VH y VL, en donde el enlazador comprende al menos un residuo de cisteína (Cys) que sirve como punto de anclaje y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona en la presente un kit que comprende una región
5 de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3 ϵ (CD3 ϵ), en donde la
región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende un scFv engrapado (spFv)
que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de
cadena ligera variable (VL) específica para la unión a CD3 ϵ y una secuencia de
enlazador entre VH y VL, en donde el enlazador comprende al menos un residuo de
10 cisteína (Cys) que sirve como punto de anclaje y un portador farmacéuticamente
aceptable.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar o ralentizar
la progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto, el método comprende
administrar al sujeto al menos un agente de unión que comprende una región de unión
15 al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3 ϵ (CD3 ϵ), en donde la región de
unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende un scFv engrapado (spFv) que
comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena
ligera variable (VL) específico para la unión a CD3 ϵ y una secuencia de enlazador entre
VH y VL, en donde el enlazador comprende al menos un residuo de cisteína (Cys) que
20 sirve como punto de anclaje y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para dirigir una célula T
a una célula diana que expresa un antígeno diana, que comprende poner en contacto
la célula T con una cantidad efectiva de un agente de unión que comprende una región
de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3 ϵ (CD3 ϵ), en donde la

región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende un scFv engrapado (spFv) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena ligera variable (VL) específica para la unión a CD3 ϵ y una secuencia de enlazador entre VH y VL, en donde el enlazador comprende a al menos un residuo de

5 cisteína (Cys) que sirve como punto de anclaje, y un portador 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 CD3 ϵ se une a la célula T y la región de unión al antígeno que se une a un segundo antígeno distinto de CD3 ϵ se une a la célula diana.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La breve descripción anterior, así como la siguiente descripción detallada de modalidades preferidas de la presente invención, se entenderán mejor cuando se lean junto con las figuras adjuntas. Sin embargo, se entenderá que la solicitud no está

15 limitada a las modalidades precisas que se muestran en las figuras.

La **Figura 1** muestra un diseño ilustrativo del scFv engrapado (spFv). La VL y la VH se conectan por un enlazador flexible mostrado como una línea disecada en la figura que contiene una secuencia de grapas CPPC (**sec. con núm. de ident.: 157**) “SS” indica enlaces disulfuro entre la secuencia de grapas en el enlazador y los puntos

20 de anclaje.

La **Figura 2** muestra una ilustración gráfica de la selección del punto de anclaje para spFv en la orientación VL-enlazador-VH. El Fv del anticuerpo humano de la línea germinal (pdb id 5I19, GLk1) se usó para los gráficos y mediciones de distancia ilustrativas. Las distancias que se muestran en líneas de guiones son entre átomos C β

de los residuos en Å. Las posiciones de marco conservadas estructuralmente con distancias deseadas se eligieron como puntos de anclaje para la mutación a Cys. Los puntos de anclaje para la orientación VL-enlazador-VH fueron la posición de Chothia 42 para la VL (K42 en la Figura) y la posición 105 para la VH (Q105 en la Figura). El
 5 residuo de la VL C-terminal (K107) y el residuo de la VH N-terminal (Q1) también se muestran.

La **Figura 3** muestra una ilustración gráfica de la selección del punto de anclaje para spFv en la orientación VH-enlazador-VL. El Fv del anticuerpo humano de la línea germinal (pdb id 5I19, GLk1) se usó para los gráficos y mediciones de distancia
 10 ilustrativas. Las distancias que se muestran en líneas de guiones son entre átomos C β de los residuos en Å. Las posiciones de marco conservadas estructuralmente con distancias deseadas se eligieron como puntos de anclaje para la mutación a Cys. Los puntos de anclaje para la orientación VH-enlazador-VL fueron la posición de Chothia 43 para la VH (K43 en la Figura) y la posición 100 para la VL (Q100 en la Figura). El
 15 residuo de la VH C-terminal (S114) y el residuo de la VL N-terminal (D1) también se muestran.

La **Figura 4** muestra una ilustración gráfica de la distancia C β (Cys1)-C β (Cys2) entre los dos residuos Cys en las dos cadenas pesadas de bisagra de IgG2a de ratón (pdb id 1igt) CPPC (**sec. con núm. de ident.: 31**). Las distancias se muestran en
 20 Ångstrom en la Figura.

La **Figura 5** muestra una ilustración gráfica de la distancia C β (Cys1)-C β (Cys2) entre los dos residuos Cys en las dos cadenas pesadas de la bisagra de IgG humana (pdb id 5dk3) CPPC (**sec. con núm. de ident.: 31**). Las distancias se muestran en Ångstrom en la Figura.

La **Figura 6** muestra los puntos de anclaje de la VL elegidos resaltados en gris y numerados como 1 y 2 por debajo de los alineamientos de aminoácidos. Las secuencias de la VL se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia. El punto de anclaje 1 de la VL (posición de Chothia 42) se usó en spFv en la orientación VL-enlazador-VH y el punto de anclaje 2 de la VL (posición de Chothia 100) se usó en spFv en la orientación VH-enlazador-VL. GLk1VL: **sec. con núm. de ident.: 32**, GLk2VL: **sec. con núm. de ident.: 33**, CAT2200VL: **sec. con núm. de ident.: 34**; CAT2200bVL: **sec. con núm. de ident.: 35**.

La **Figura 7** muestra los puntos de anclaje de la VH elegidos resaltados en gris y numerados como 1 y 2 por debajo de los alineamientos de aminoácidos. Las secuencias de la VH se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia. El punto de anclaje 1 de la VH (posición de Chothia 105) se usó en spFv en la orientación VL-enlazador-VH y el punto de anclaje 2 de la VH (posición de Chothia 43) se usó en spFv en la orientación VH-enlazador-VL. GLk1VH: **sec. con núm. de ident.: 36**; GLk2VH: **sec. con núm. de ident.: 37**, CAT2200aVH: **sec. con núm. de ident.: 38**.

La **Figura 8** muestra la estructura de GLk1 spFv VL-VH. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 9** muestra la estructura de GLk1 spFv VH-VL. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 10** muestra la estructura de GLk2 spFv VH-VL. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 11** muestra la estructura de CAT2200b spFv VH-VL. La formación de la grapa entre los puntos de anclaje de la VH y la VL y el enlazador es evidente a partir de la estructura.

La **Figura 12** muestra la comparación entre el CAT2200b spFv VH-VL no unido (arriba) y el CAT2200a scFv VL-VH unido a IL-17A (abajo).

La **Figura 13** muestra la comparación entre las vistas delanteras de las estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido (arriba) y el CAT2200a spFv VL-VH unido a IL-17A (abajo).

La **Figura 14** muestra la comparación entre las vistas posteriores de las estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido (arriba) y el CAT2200a spFv VL-VH unido a IL-17A (abajo).

La **Figura 15** muestra la unión dependiente de la dosis del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) a células tumorales de próstata humana LNCap mediante citometría de flujo.

La **Figura 16** muestra la unión dependiente de la dosis del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) a células PAN-T mediante citometría de flujo.

La **Figura 17** muestra la citotoxicidad dependiente de la dosis del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en PBMC humanas.

La **Figura 18** muestra la citotoxicidad dependiente de la dosis del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en células Pan T humanas.

La **Figura 19** 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 20** 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 21** 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 22A y 22B** muestran la unión de **NPP3B815** a líneas celulares tumorales endógenas que expresan ENPP3 y células T aisladas. La **Figura 22A** 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 22B** 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

5 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 23** muestra la unión de NPP3B815 a líneas celulares que
 10 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
 15 ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; ENPP2, miembro 2 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; ENPP3, miembro 3 de la familia de
 20 ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa.

La **Figura 24** 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
 20 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 25** 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 26A y 26B** 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 26A**) Evaluación a base de Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para Nuclight red) 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 26B**) 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 27A y 27B** muestran la destrucción de células tumorales inducida por **NPP3B815** en presencia de células T aisladas de múltiples donantes en diferentes relaciones E:T. (**Figura 27A**) Evaluación a base de Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para Nuclight red) 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 27B**)

Evaluación a base de Incucyte de la destrucción de células tumorales (es decir, pérdida de células positivas para Nuclight red) 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 28** 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

5 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;

10 TNF, factor de necrosis tumoral.

La **Figura 29** 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

15 (**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,

20 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 30A y 30B** muestran la unión de la molécula herramienta NPP3B847 a células T y células que expresan ENPP3 de cynomolgus. (**Figura 30A**)

Unión de la herramienta ENPP3xCD3 (NPP3B847; aglutinante de ENPP3 NPP3B56 con CD3B219 con reacción cruzada de cyno) y el control de isotipo (79C3B613) en la línea celular HepG2-huENPP3-KO con ENPP3-OE de cyno se evaluó mediante citometría de flujo. Las barras de error son SEM. (**Figura 30B**) Se evaluó la unión de la

5 herramienta ENPP3xCD3 (NPP3B847) en células T humanas y de cyno. 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 31** muestra la activación de células T humanas y de mono

10 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; aglutinante de ENPP3 NPP3B56 emparejado con CD3B219 con reacción

15 cruzada de cyno) 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

20 ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Relación E:T, relación de efector a célula diana; SEM, error estándar de la media

Las **Figuras 32A y 32B** 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 32A**)

Los volúmenes tumorales de grupo se grafican como la media $\pm$ 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,

5 14, 18, 21, 25, 28, 31 y 34 (representados por la línea debajo del eje X). (**Figura 32B**)

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

10 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 33A y 33B** muestran el efecto de NPP3B194 ([scFv] ENPP3xCD3 sin grapar) sobre xenoinjertos establecidos con HepG2 en ratones (Estudio P764Y). A

15 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**

33A) Los volúmenes tumorales de grupo se grafican como la media $\pm$ 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,

20 25, 29, 32, 36 y 39 (representado por la línea debajo del eje X). (**Figura 33B**) Gráficos

de tumores individuales para grupos. * Indica una diferencia significativa de los grupos tratados con NPP3B194 el día 52 (n $\geq$ 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 34** muestra la unión de GUCY2C_mAb a GUCY2C humano y de cyno.

La **Figura 35A** muestra la unión de GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2 a la línea celular

5 T84. La **Figura 35B** muestra la unión de GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2 a células T.

La **Figura 36** muestra la citometría de flujo de competencia entre GUCY2C_biAb-1 y biAb de referencia.

La **Figura 37** muestra la citotoxicidad mediada por células T (panel superior) y la activación de células T de GUCY2CxCD3_biAb-1, GUCY2CxCD3_biAb-2 y biAb de
10 referencia.

La **Figura 38** muestra la eficacia antitumoral de GUCY2CxCD3_biAb-1 en un modelo HT55 CDX humanizado de células T.

La **Figura 39** muestra la unión de CDC3B253 a células NCI-H146.

La **Figura 40** muestra la unión de CDC3B253 a células GSU.

15 La **Figura 41** muestra la unión de CDC3B253 a células NUGC-4.

La **Figura 42** muestra la unión de CDC3B253 a células NUGC-4 CLDN18.2 KO.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

Los métodos descritos pueden entenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conexión con las figuras adjuntas, que forman una parte de esta descripción. Debe entenderse que los métodos descritos no se limitan a los métodos específicos descritos y/o mostrados en la presente, y que la terminología usada en la presente es para describir modalidades particulares solamente a manera de ejemplo y no pretende ser limitante de los métodos reivindicados.

A menos que se indique específicamente de cualquier otra manera, cualquier descripción de un posible mecanismo o modo de acción o razón de mejora pretende ser solamente ilustrativa, y los métodos descritos no deben verse limitados por la precisión o imprecisión de cualquiera de estos mecanismos o modos de acción o razones de mejora sugeridos.

Cuando se menciona o establece un rango de valores numéricos en la presente descripción, el rango incluye los puntos finales de estos y todos los números enteros y fracciones individuales dentro del rango, y también incluye cada uno de los rangos más estrechos de estos formados por todas las diversas combinaciones posibles de esos puntos finales y números enteros internos y fracciones para formar subgrupos del grupo más grande de valores dentro del rango establecido en la misma medida que si cada uno de esos rangos más estrechos se mencionara explícitamente. Cuando un rango de valores numéricos se indica en la presente descripción como mayor que un valor indicado, el rango es, sin embargo, finito y se limita en su extremo superior por un valor que se puede operar dentro del contexto de los métodos como se describe en la presente descripción. Cuando un rango de valores numéricos se indica en la presente

descripción como menor que un valor indicado, el rango, sin embargo, está limitado en su extremo inferior por un valor distinto de cero. No se pretende limitar el alcance de los métodos a los valores específicos que se mencionan al definir un rango. Todos los rangos son inclusivos y combinables.

- 5 Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra modalidad. La referencia a un valor numérico particular incluye al menos ese valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

10 Se entenderá que ciertas características de los métodos descritos que, para claridad, se describen en la presente invención en el contexto de modalidades separadas, pueden proporcionarse, también, combinadas en una sola modalidad. A la inversa, diversas características de los métodos descritos que, por razones de brevedad, se describen en el contexto de una modalidad única se pueden, además, proporcionar por separado o en cualquier subcombinación.

- 15 Como se usa en la presente descripción, las formas singulares “un”, “uno/una” y “el/la” incluyen el plural.

 Varios términos relacionados con aspectos de la descripción se usan en toda la especificación y las reivindicaciones. Se asignará a dichos términos su significado común en la técnica a menos que se indique de otra manera. Otros términos
20 específicamente definidos se interpretarán de manera consistente con las definiciones proporcionadas en la presente.

 El término “aproximadamente” se usa para abarcar variaciones de $\pm 10\%$ o menos, variaciones de $\pm 5\%$ o menos, variaciones de $\pm 1\%$ o menos, variaciones de $\pm 0,5\%$ o menos o variaciones de $\pm 0,1\%$ o menos del valor especificado.

Los términos transicionales “que comprende”, “que consiste esencialmente en” y “que consiste en” pretenden connotar sus significados generalmente aceptados en el lenguaje de patentes; es decir, (i) “que comprende”, que es sinónimo de “que incluye”, “que contiene” o “caracterizado por”, es inclusivo o abierto y no excluye etapas o elementos no enumerados adicionales del método; (ii) “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación; y (iii) “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a las etapas o materiales especificados “y los que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)” de la descripción reivindicada. Las modalidades descritas en términos de la frase “que comprende” (o sus equivalentes) también proporcionan como modalidades las que se describen independientemente en términos de “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”. Las modalidades descritas en términos de la frase “que consiste esencialmente en” (o sus equivalentes) también proporcionan como modalidades las que se describen independientemente en términos de “que consiste en”.

FRAGMENTOS DE ANTICUERPO CD3 ESTABILIZADOS

La presente descripción proporciona fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno que se unen a CD3 y moléculas de unión al antígeno que comprenden los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno que se unen a CD3. 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 epítomos 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 que comprenden las moléculas de unión al antígeno 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 epítipo de CD3. 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

5 inmunoglobulina.

Las variantes y los derivados de anticuerpos incluyen fragmentos funcionales de anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un epítipo de CD3. 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

10 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

15 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 epítipo 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

20 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, la región de unión a CD3 son moléculas de anticuerpo de cadena sencilla engrapadas (*p. ej.*, spFv). En algunas modalidades, las moléculas de unión al antígeno que comprenden el brazo de unión a spFv CD3 son anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos, nanocuerpos, dicuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio variable dual (DVD, por sus siglas en inglés), o anticuerpos de dominio variable único (*p. ej.*, anticuerpos de camélidos). Cualquier VH y los dominios VL que se unen a CD3 pueden diseñarse por ingeniería en una molécula de unión a spFv CD3.

“CD3” se refiere a un antígeno que se expresa en las células T como parte del complejo del receptor de células T multimolecular (TCR) y que consiste en un homodímero o heterodímero formado a partir de la asociación de dos o cuatro cadenas de receptores: CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 zeta y CD3 gamma. El CD3 épsilon

humano comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1. El dominio extracelular abarca los residuos 23-126 del CD3 de longitud completa. Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas de la presente descripción pretenden referirse a la versión humana de los respectivos proteína,

5 polipéptido o fragmento de proteína a menos que se especifiquen explícitamente como provenientes de una especie no humana. Por lo tanto, “CD3” significa CD3 humano a menos que se especifique que proviene de una especie no humana, por ejemplo, “CD3 de ratón” “CD3 de mono”, etc.

sec. con núm. de ident.: 1 (CD3 épsilon humano)

10 MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL
WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLR
ARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQR
GQNKERPPPVPNPDIPIRKGQRDLYSGLNQRR

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo” se entiende en un sentido

15 amplio e incluye las moléculas de inmunoglobulina que incluyen los anticuerpos monoclonales que incluyen los anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos, anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos, diméricos, tetraméricos o multiméricos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominios y cualquier otra configuración
20 modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de unión al antígeno de la especificidad requerida. El término anticuerpo incluye anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos.

Generalmente, los anticuerpos son proteínas o cadenas peptídicas que exhiben especificidad de unión a un antígeno específico. Las estructuras de anticuerpo son bien

conocidas. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales (es decir, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), en dependencia de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. IgA e IgG se subclasifican, además, como los isotipos de IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Por consiguiente, los anticuerpos de la

5 invención pueden ser de cualquiera de las cinco clases principales o subclases correspondientes. Preferentemente, los anticuerpos de la invención son IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las cadenas ligeras de anticuerpo de la especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, específicamente kappa y lambda, basadas en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Por

10 consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden contener un dominio constante de cadena ligera kappa o lambda. De acuerdo con algunas modalidades, los anticuerpos de la invención incluyen las regiones constantes de la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos humanos o de la rata. Además de los dominios constantes de cadena pesada y ligera, los anticuerpos contienen una región de unión al antígeno que está

15 compuesta por una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, cada una de las cuales contiene tres dominios (es decir, regiones determinantes de complementariedad 1-3; CDR1, CDR2 y CDR3). Los dominios de la región variable de cadena ligera se denominan alternativamente LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y los dominios de la región variable de cadena pesada se denominan

20 alternativamente HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de cadena pesada o ligera que se encuentra involucrado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada o ligera (VH y VL, respectivamente)

comprenden cuatro regiones marco (FR) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

“Regiones determinantes de complementariedad” (CDR, por sus siglas en inglés) son regiones de anticuerpos que se unen a un antígeno. Existen seis CDR en la VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDR en la VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). Las CDR pueden definirse usando diversas delineaciones tales como Kabat (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211-50; Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77) and AbM (Martin et al. (1996) J Mol Biol 263: 800-15.). Se describe la correspondencia entre las diversas delineaciones y la numeración de la región variable (*ver, p. ej.,* Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77; Honegger and Pluckthun (2001), J Mol Biol 309:657-70; base de datos International Immunogenetics (IMGT); Recursos de la web, http://www_imgt_org). Los programas disponibles tales como abYsis por UCL Business PLC pueden usarse para delinear las CDR. Los términos “CDR”, “HCDR1”, “HCDR2”, “HCDR3”, “LCDR1”, “LCDR2” y “LCDR3”, como se usan en la presente descripción, incluyen las CDR definidas por cualquiera de los métodos descritos *supra*, Kabat, Chothia, IMGT o AbM, a menos que se indique explícitamente de otra manera en la especificación.

Un experto en la técnica conoce bien la correspondencia entre el sistema de numeración, que incluye, por ejemplo, la numeración de Kabat y el sistema de numeración único de IMGT (*ver, p. ej.,* Kabat, *supra*; Chothia, *supra*; Martin, *supra*; Lefranc et al., *supra*).

Tabla 1.

	IMGT	Kabat	AbM	Chothia
CDR1 de V _H	27-38	31-35	26-35	26-32
CDR2 de V _H	56-65	50-65	50-58	53-55
CDR3 de V _H	105-117	95-102	95-102	96-101
CDR1 de V _L	27-38	24-34	24-34	26-32
CDR2 de V _L	56-65	50-56	50-56	50-52
CDR3 de V _L	105-117	89-97	89-97	91-96

“Se une específicamente”, “unión específica”, “que se une específicamente” o “se une” se refiere a una molécula proteica que se une a un antígeno o a un epítopo dentro del antígeno con mayor afinidad que a otros antígenos. Típicamente, la molécula proteica se une al antígeno o al epítopo dentro del antígeno con una constante de disociación en equilibrio (KD) de aproximadamente 1×10^{-7} M o menos, por ejemplo, aproximadamente 5×10^{-8} M o menos, aproximadamente 1×10^{-8} M o menos, aproximadamente 1×10^{-9} M o menos, aproximadamente 1×10^{-10} M o menos, aproximadamente 1×10^{-11} M o menos, o aproximadamente 1×10^{-12} M o menos, típicamente con la KD que es al menos cien veces menor que su KD para la unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína). El término “KD” se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de KD a Ka (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para los anticuerpos pueden determinarse usando métodos en la técnica en vista de la presente descripción. Por ejemplo, la KD de un anticuerpo puede determinarse mediante resonancia de plasmón de superficie, tal como usando un sistema biosensor, p. ej., un sistema Biacore®, o usando tecnología de interferometría de biocapa, tal como un sistema

Octet RED96. Cuanto menor es el valor de la KD de un anticuerpo, mayor es la afinidad con la que el anticuerpo se une a un antígeno diana.

Como se usa en la presente, un anticuerpo que “se une a PSMA” o que “se une específicamente al PSMA” se refiere a un anticuerpo que se une a PSMA,

- 5 preferentemente al PSMA humano, con una KD de 1×10^{-7} M o menos, preferentemente, 1×10^{-8} M o menos, con mayor preferencia 5×10^{-9} M o menos, 1×10^{-9} M o menos, 5×10^{-10} M o menos, o 1×10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 1×10^{-11} M, 5×10^{-12} M, o 1×10^{-12} M o menos.

- 10 Como se usa en la presente, un anticuerpo que “se une a CD3” o que “se une específicamente a CD3” se refiere a un anticuerpo que se une a CD3, preferentemente al CD3 humano, con una KD de 1×10^{-7} M o menos, preferentemente, 1×10^{-8} M o menos, con mayor preferencia 5×10^{-9} M o menos, 1×10^{-9} M o menos, 5×10^{-10} M o menos o 1×10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 1×10^{-11} M, 5×10^{-12} M o 1×10^{-12} M o menos.

- 15 “Biespecífico” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a dos antígenos distintos o a dos epítomos 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 (homólogas), tales como de ser humano o de mono, por ejemplo, macaca cynomolgus (cynomolgus, cyno) o pan troglodytes, o puede unirse a un epítomo que se comparte entre dos o más antígenos
20 distintos.

“Anticuerpo biespecífico CD3” se refiere a un anticuerpo con un primer brazo de unión que se une a un primer antígeno diana de interés y un segundo brazo de unión que se une a CD3.

En algunas modalidades, uno o más brazos de unión al antígeno del anticuerpo biespecífico CD3 incluye fragmentos Fv, fragmentos scFv monocatenarios (scFv), fragmentos scFv estabilizados por enlace disulfuro monocatenario o fragmento scFv engrapado (spFv), Fab, F(ab)2, o anticuerpos monocatenarios.

5 El término “anticuerpos intactos” se refiere a un anticuerpo que tiene una estructura similar a un anticuerpo nativo. Los “anticuerpos intactos” comprenden dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) interconectadas por enlaces disulfuro, así como por los multímeros de estos (p. ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de
10 cadena pesada (que comprende los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3). Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés) y una región constante de cadena ligera (CL, por sus siglas en inglés). Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, específicamente kappa (κ) y lambda (λ), sobre la
15 base de la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes. Las regiones de VH y VL pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones de marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro segmentos de FR, dispuestos desde el terminal amino
20 hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Como se usa en la presente descripción, el término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser polipéptidos sintéticos, que pueden obtenerse enzimáticamente

o diseñados por ingeniería genéticamente e incluyen porciones de una inmunoglobulina que se une a un antígeno, tal como una VH, una VL, una VH y una VL, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd y un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂, un dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un diacuerpo estabilizado con disulfuro (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo monocatenaria (scFv), o una molécula de anticuerpo monocatenaria estabilizada por disulfuro (spFv o scFv engrapado), un anticuerpo de dominio único (sdab), un dímero scFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo multiespecífico formado a partir de una porción de un anticuerpo que comprende una o más CDR, un anticuerpo de dominio único camélico, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de dominio (dAb) que consiste en un dominio de VH o un dominio de VL, un dominio IgNAR de variable tiburón, un dominio de VH camélico, un dominio de VHH, una unidad de reconocimiento mínima formada por los residuos de aminoácidos que imitan las CDR de un anticuerpo, tales como una porción de FR3-CDR3-FR4, la HCDR1, la HCDR2 y/o la HCDR3 y la LCDR1, la LCDR2 y/o la LCDR3, un supercóntigo alternativo que se une a un antígeno, un anticuerpo de dominio bivalente, una proteína multiespecífica que comprende el anticuerpo o cualquier otro fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno pero no comprende una estructura de anticuerpo completa.

En algunas modalidades, el método de la descripción se practica al administrar un anticuerpo biespecífico CD3 que comprende una cadena pesada (HC, por sus siglas en inglés), una cadena ligera (LC, por sus siglas en inglés) y un Fv monocatenario engrapado (spFv).

El “Fv monocatenario” o “scFv” son proteínas 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 la VL y la VH se encuentran enlazadas contiguamente a través de un enlazador de polipéptido, y son capaces de expresarse como un polipéptido monocatenario. A

5 Un scFv puede tener las regiones variables de la VL y VH en cualquier orden, p. ej., con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender una VL-enlazador-VH o puede comprender una VH-enlazador-VL. Un Fv puede comprender un péptido enlazador, tal como de dos a aproximadamente ocho
10 cadena pesada y la región variable de cadena ligera. 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 en relación con la una otra de tal manera que retengan la actividad deseada, tal como la unión al PSMA o la unión al
15 CD3.

 “Fv de cadena única engrapado”, “scFv grapado” 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. Por lo general, el spFv puede comprender un enlace disulfuro entre el VH y el enlazador, y un enlace disulfuro entre el VL y el enlazador, o dos enlaces disulfuro
20 entre el VH y el enlazador y el VL y el enlazador.

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

“Punto de anclaje” se refiere a un residuo de una estructura VH o VL en el scFv que se puede mutar en Cys sin efecto adverso para la estructura general del scFv y es capaz de formar un enlace disulfuro con una Cys que reside en el enlazador del scFv.

“VH cisteína” o “VH Cys” se refiere a un residuo Cys que reside en el marco de
5 la VH.

“VL cisteína” o “VL Cys” se refiere a un residuo Cys que reside en el marco de la VL.

El enlazador puede tener una longitud de aproximadamente 5-50 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-40
10 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-35 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-30 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-25 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 10-20 aminoácidos.
15 En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 15-20 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 6 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 7 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 8 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 9
20 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 10 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 11 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 12 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 13 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 14

aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 15 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 16 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 17 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 18 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 19 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 20 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 21 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 22 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 23 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 24 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 25 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 26 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 27 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 28 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 29 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 30 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 31 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 32 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 33 aminoácidos. En algunas modalidades, el

el enlazador tiene una longitud de 34 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 35 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 36 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 37 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud

de 38 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 39 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador tiene una longitud de 40 aminoácidos.

En la Tabla 2 se enumeran enlazadores ilustrativos que contienen dos residuos

5 Cys.

Tabla 2. Las secuencias de aminoácidos de los enlazadores spFv con dos residuos Cys.

Nombre del enlazador	Secuencia de aminoácidos del enlazador	Enlazador sec. con núm. de ident.:
Enlazador 35	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	2
Enlazador 36	GGGSGGCPPCGGSGG	3
Enlazador 37	GGSGGSGGCPPCGSGG	4
Enlazador 38	GGGSGGSGGCPPCGSGG	5
Enlazador 39	GGGSGGGSGCPCGGGG	6

En algunas modalidades, el método de la descripción se practica al administrar
 10 un anticuerpo biespecífico CD3 que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un primer dominio de unión que se une a un antígeno tumoral de interés y un segundo dominio de unión que se une a CD3, en donde el segundo dominio de unión que se une a CD3 comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un spFv que comprende un enlazador de la Tabla 2.

15 En algunas modalidades, el método de la descripción se practica al administrar un anticuerpo biespecífico CD3 que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un primer dominio de unión que se une a un antígeno tumoral de interés y un segundo dominio de unión que se une a CD3, en donde el segundo dominio de unión que se une a CD3 comprende, consiste en y/o consiste

esencialmente en un spFv que comprende una VL, un enlazador de la Tabla 2 y una VH (VL-Enlazador-VH).

En algunas modalidades, el método de la descripción se practica al administrar un anticuerpo biespecífico CD3 que comprende, consiste en y/o consiste

- 5 esencialmente en un primer dominio de unión que se une a un antígeno tumoral de interés y un dominio de unión que se une a CD3, en donde el dominio de unión que se une a CD3 comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un spFv que comprende una VH, un enlazador de la Tabla 2 y una VL (VH-Enlazador-VL).

- 10 En algunas modalidades, el spFv comprende un primer enlace disulfuro entre una posición VH expuesta a la superficie estructuralmente conservada que está mutada a cisteína (Cys) y un primer enlazador Cys; y un segundo enlace disulfuro entre una posición VL estructuralmente conservada expuesta a la superficie que está mutada a Cys y un segundo enlazador Cys.

- 15 En algunas modalidades, la VH Cys de la spFv está en la posición H3, H5, H40, H43, H46 o H105, donde la numeración de residuos es de acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades, la VL Cys de la spFv está en la posición L3, L5, L39, L42, L43, L45, L100 o L102, donde la numeración de residuos es de acuerdo con Chothia.

- 20 En algunas modalidades, la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L42; la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L100; la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L3; la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L5; la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L39; la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L42; la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L45; la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L100; la VH Cys está en H3 y la VL Cys está en L102; la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L3; la VH Cys

está en H5 y la VL Cys está en L5; la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L39; la
 VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L42; la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en
 L45; la VH Cys está en H5 y la VL Cys está en L100; la VH Cys está en H5 y la VL Cys
 está en L102; la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L3; la VH Cys está en H40 y
 5 la VL Cys está en L5; la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L39; la VH Cys está
 en H40 y la VL Cys está en L42; la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en L45; la VH
 Cys está en H40 y la VL Cys está en L100; la VH Cys está en H40 y la VL Cys está en
 L102; la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L3; la VH Cys está en H43 y la VL
 Cys está en L5; la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L39; la VH Cys está en H43
 10 y la VL Cys está en L42; la VH Cys está en H43 y la VL Cys está en L45; la VH Cys
 está en H43 y la VL Cys está en L102; la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L3;
 la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L5; la VH Cys está en H46 y la VL Cys está
 en L39; la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L42; la VH Cys está en H46 y la VL
 Cys está en L45; la VH Cys está en H46 y la VL Cys está en L100; la VH Cys está en
 15 H46 y la VL Cys está en L102; la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L3; la VH
 Cys está en H105 y la VL Cys está en L5; la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en
 L39; la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L43; la VH Cys está en H105 y la VL
 Cys está en L45; la VH Cys está en H105 y la VL Cys está en L100; o la VH Cys está
 en H105 y la VL Cys está en L102, en donde la numeración de los residuos está de
 20 acuerdo con Chothia.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste en y/o consiste
 esencialmente en un enlazador de la Tabla 2.

En algunas modalidades, el enlazador spFv comprende, consiste en y/o consiste
 esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2. En

algunas modalidades, el enlazador spFv comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3. En

algunas modalidades, el enlazador spFv comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4. En

5 algunas modalidades, el enlazador spFv comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5. En

algunas modalidades, el enlazador spFv comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6.

En algunas modalidades, el enlazador spFv es el enlazador de secuencia

10 GGGSGGSGGCPPCGSGG (sec. con núm. de ident.: 2). En algunas modalidades, el

enlazador spFv es el enlazador de secuencia GGGSGGCPPCGGSGG (sec. con

núm. de ident.: 3). En algunas modalidades, el enlazador spFv es el enlazador de

secuencia GGS GGSGGCPPCGSGG (sec. con núm. de ident.: 4). En algunas

modalidades, el enlazador spFv es el enlazador de secuencia

15 GGGSGGSGGCPPCGSGG (sec. con núm. de ident.: 5). En algunas modalidades, el

enlazador spFv es el enlazador de secuencia GGGSGGGSGCPPCGGGG (sec. con

núm. de ident.: 6).

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste

esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una

20 Cys en H105; una VL comprende una Cys en L42; y un enlazador que comprende,

consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec.

con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-

L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H105; una VL comprende una Cys en L42; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una VH que comprende una Cys en H105; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L45; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H105; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L39; y un enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H5; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L42; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H5; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L45; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una
 5 secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H5; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys
 10 en L39; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una
 15 Cys en H3; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L42; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste en y/o consiste
 20 esencialmente en una VH que comprende una Cys en H3; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L45; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H3; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L39; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una
 5 secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VL-L-VH.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H43; una VL comprende una Cys en L100; y un enlazador que comprende,
 10 consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una
 15 Cys en H43; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L102; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste
 20 esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H43; una VL comprende una Cys en L5; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H43; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L3; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H40; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L100; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H40; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L102; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una VH que comprende una Cys en H40; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L5; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H40; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L3; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H46; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L100; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una VH que comprende una Cys en H46; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L102; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H46; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L5; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

En algunas modalidades, el spFv comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una VH que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en una Cys en H46; una VL que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una Cys en L3; y un enlazador que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 2, 3, 4, 5, o 6; en donde el spFv se encuentra en la orientación VH-L-VL.

Si bien los ejemplos específicos describen el spFv con dos enlaces disulfuro, se deduce fácilmente que puede fabricarse y usarse un spFv con un enlace disulfuro, formado entre el Cys enlazador y la VH Cys o la VL Cys, generando moléculas “medio ancladas”. Las posiciones de anclaje son iguales como en los spFv que tienen uno o dos enlaces disulfuro. La posición del enlazador Cys puede variar en la molécula medio anclada siempre y cuando cumpla los requisitos de distancia y geometría para la formación de enlaces disulfuro con el punto de anclaje. Se espera que el spFv medio anclado restringirá el movimiento relativo al VL/VH similar al par VL/VH estabilizado con dos enlaces disulfuro y, por lo tanto, también será estabilizador.

En algunas modalidades, los anticuerpos CD3 multiespecíficos usados en el método de tratamiento de la descripción incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos que se unen específicamente a CD3.

“Anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que está optimizado para tener una mínima respuesta inmune cuando se administra a un sujeto humano. Las regiones variables de anticuerpos humanos se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Si el anticuerpo humano contiene una región constante o una porción de la región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. El anticuerpo humano comprende regiones

variables de cadena pesada y ligera que se “derivan de” secuencias de origen humano si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulinas reordenadas. Tales sistemas ilustrativos son genotecas de inmunoglobulinas humanas presentadas en fagos y animales transgénicos no humanos, tales como ratones o ratas, que portan loci de inmunoglobulina humana. El “anticuerpo humano” contiene, típicamente, diferencias de aminoácidos cuando se compara con las inmunoglobulinas expresadas en seres humanos debido a las diferencias entre los sistemas usados para obtener el anticuerpo y los loci de inmunoglobulina humana, la introducción de mutaciones somáticas o introducción intencional de sustituciones en las armazones o las CDR, o ambos.

Típicamente, el “anticuerpo humano” es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulina reordenada. En algunos casos, el “anticuerpo humano” puede contener secuencias de marco consenso derivadas a partir de análisis de secuencias de marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86, o una HCDR3 sintética incorporada en genotecas de inmunoglobulinas humanas presentadas en fago, por ejemplo, como se describe en Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96, y en la publicación de la patente internacional núm. WO2009/085462. Los anticuerpos en los que al menos una CDR se deriva de una especie no humana no se incluyen en la definición de “anticuerpo humano”.

Los animales transgénicos, tales como ratones, ratas o pollos, que portan loci de inmunoglobulina humana (Ig) en sus genomas pueden usarse para generar anticuerpos usados en el método de la descripción y se describen por ejemplo en la patente de los EE. UU. núm. 6.150.584, la publicación de patente internacional núm. WO1999/45962, las publicaciones de patentes internacionales núms. WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 y WO1990/04036. Los loci endógenos de inmunoglobulina en tales animales pueden desestabilizarse o delecionarse, y al menos un locus completo o parcial de inmunoglobulina humana puede insertarse en el genoma del animal usando recombinación homóloga o no homóloga, usando transcromosomas, o usando minigenes. Las compañías tales como Regeneron (World Wide Web: regeneron.com), Harbour Antibodies (World Wide Web: harbourantibodies.com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (World Wide Web: omtinc.net), KyMab (World Wide Web: kymab.com), Trianni (World Wide Web: trianni.com) y Ablexis (World Wide Web: ablexis.com) pueden contactarse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado.

Los anticuerpos generados por inmunizar animales no humanos pueden humanizarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado o modificado tiene uno o más residuos de aminoácido de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no se limita a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Las técnicas de humanización ilustrativas que incluyen la selección de marcos de aceptor humano incluyen injerto de CDR (patente de los EE. UU. núm. 5.225.539), injerto de SDR (patente de los EE. UU. núm. 6.818.749) Resurgimiento (Padlan, (1991) Mol Immunol 28:489-499), Resurgimiento de residuo determinante de especificidad (publicación de patente de los EE. UU. núm.

2010/0261620), adaptación de marcos humanos (patente de los EE. UU. núm. 8.748.356) o superhumanización (patente de los EE. UU. núm. 7.709.226). En estos métodos, las CDR o un subconjunto de residuos de CDR de anticuerpos parentales se transfieren sobre marcos humanos que pueden seleccionarse basados en su

5 homología global con las estructuras parentales, basados en la similitud en la longitud de CDR, o identidad de estructura canónica, o una combinación de estos.

Los dominios de unión al antígeno humanizados pueden optimizarse adicionalmente para mejorar su selectividad o afinidad a un antígeno deseado incorporando residuos de soporte de marco alterados para preservar la afinidad de

10 unión (retromutaciones) mediante técnicas tales como las descritas en las publicaciones de patente internacionales núms. WO1090/007861 y WO1992/22653 o introduciendo variación en cualquiera de las CDR por ejemplo para mejorar la afinidad del dominio de unión al antígeno.

El anticuerpo biespecífico CD3 spFv usado de acuerdo con la presente

15 invención puede producirse mediante medios recombinantes, incluyendo de preparaciones a partir de transgénicos o células de mamífero o puede purificarse a partir de otras fuentes biológicas, tal como se describe en la presente o como se conoce en la técnica.

Los anticuerpos usados en el método de la presente invención pueden

20 producirse mediante una línea celular, una línea celular mezclada, una célula inmortalizada o población clonal de células inmortalizadas, como se conoce en la técnica. Las líneas celulares pueden diseñarse por ingeniería para expresar los anticuerpos de la descripción y el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente en el medio.

El lisado celular o sobrenadante que comprende el anticuerpo spFv CD3 puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice),
 5 cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3 ϵ proporcionada en la presente comprende una HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:7, 13, 15, 17, o 23; (ii) una HCDR2 que
 10 comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:8, 14, 16, 18 o 24, (iii) una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:9, 19 o 25; (iv) una LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de ident.:10, 20 o 26; (v) una LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de las sec. con núm. de
 15 ident.:11, 21 o DSS; y/o (vi) una LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12 o 22.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3 ϵ 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
 20 sec. con núm. de ident.:8, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12.

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.:13, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:14, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12.

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.:15, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12.

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.: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 la sec. con núm. de ident.:21, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22.

En algunas modalidades específicas, en la región de unión a CD3 ϵ proporcionada en la presente, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:25, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12.

En una modalidad, se proporciona en la presente una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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 9, respectivamente. En otra modalidad, en la presente descripción se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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.:10, 11, y 12, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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 9, 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.:10, 11, y 12, respectivamente.

En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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.:13, 14, y 9, respectivamente. En otra modalidad, en la presente descripción se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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.:10, 11, y 12,

5 respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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.:13, 14, y 9, respectivamente y (ii) una VL que comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con
10 núms. de ident.:10, 11, y 12, respectivamente.

En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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.:15, 16, y 9, respectivamente. En otra modalidad, en la presente
15 descripción se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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.:10, 11, y 12, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una
20 HCDR2, y una HCDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:15, 16, y 9, 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.:10, 11 y 12, respectivamente.

En una modalidad, se proporciona en la presente una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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 descripción se

5 proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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 22, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , que comprende: (i) una VH que comprende una HCDR1, una HCDR2, y una HCDR3 que
10 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 22, respectivamente.

En una modalidad, en la presente descripción se proporciona una región de
15 unión que se une a CD3 ϵ , 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.:23, 24, y 25, respectivamente. En otra modalidad, se proporciona en la presente una región de unión que se une a CD3 ϵ , que comprende una VL que
comprende una LCDR1, una LCDR2, y una LCDR3 que tienen una secuencia de
20 aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:26, DSS y la sec. con núm. de ident.: 12, respectivamente. En otra modalidad, en la presente se proporciona una región de unión que se une a CD3 ϵ , 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.:23, 24, y 25, 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.:26, DSS y la sec. con núm. de ident.:12, respectivamente.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3 ϵ comprende además una o más regiones marco. Las regiones marco descritas en la presente se determinan

5 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

10 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

15 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,

20 el sistema de numeración de IMGT o el sistema de numeración de Chothia. En algunas modalidades, la región de unión a CD3 ϵ comprende además una o más regiones marco de las sec. con núms. de ident.:28, 29, 202 o 203.

En algunas modalidades, la región de unión a CD3 ϵ proporcionada en la presente descripción comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos

de la sec. con núm. de ident.:28, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:29. En algunas modalidades, la región de unión a CD3 ϵ proporcionada en la presente descripción comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:202, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:203.

En ciertas modalidades, la región de unión a CD3 ϵ proporcionada en la presente comprende secuencias de aminoácidos con cierto porcentaje de identidad en relación con cualquier región de unión a CD3 ϵ 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 CD3 ϵ 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 CD3 ϵ que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a la CD3 ϵ . 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 CD3 ϵ proporcionada en la presente incluye modificaciones posteriores a la traducción de una secuencia de referencia.

Tabla 3. 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.:7)	GYTFTRS (sec. con núm. de ident.: 13)	GYTFTRSTMH (sec. con núm. de ident.: 15)	TRSTMH (sec. con núm. de ident.: 17)	GYTFTRST (sec. con núm. de ident.: 23)
Región variable de	YINPSSAYTN YNQKFQG	NPSSAY	YINPSSAYTN	WIGYINPSSAYTN	INPSSAYT

cadena pesada CDR2	(sec. con núm. de ident.:8)	(sec. con núm. de ident.: 14)	(sec. con núm. de ident.:16)	(sec. con núm. de ident.: 18)	(sec. con núm. de ident.: 24)
Región variable de cadena pesada CDR3	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 9)	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 9)	PQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 9)	ASPQVHYDYAGFP (sec. con núm. de ident.: 19)	ASPQVHYDYAGFPY (sec. con núm. de ident.: 25)
Región variable de cadena ligera CDR1	SASSSVSYMNI (sec. con núm. de ident.: 10)	SASSSVSYMNI (sec. con núm. de ident.: 10)	SASSSVSYMNI (sec. con núm. de ident.: 10)	SYMNIWY (sec. con núm. de ident.:20)	SSVSY (sec. con núm. de ident.: 26)
Región variable de cadena ligera CDR2	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 11)	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 11)	DSSKLAS (sec. con núm. de ident.: 11)	RWIYDSSKLAI (sec. con núm. de ident.: 21)	DSS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.: 12)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.: 12)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.: 12)	QQWSRNPP (sec. con núm. de ident.: 22)	QQWSRNPPT (sec. con núm. de ident.: 12)

Secuencia de aminoácidos de VH de CD3B2030-N106A. sec. con núm. de ident.:28

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPSSAYT
 NYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGTL
 5 VTVSS

Secuencia de aminoácidos de VL de CD3B2030-N106A. sec. con núm. de ident.:29

EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNIWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASGVPA
 RFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE SPFV (VL-ENLAZADOR VH) DE

10 CD3B2030-N106A; Sec. con núm. de ident.: 30

EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNIWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASGV
 PARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGSG
 GCPPCGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGL

EWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASPQVHY
DYAGFPYWGCGLTVTVSS

Secuencia de ADN que codifica VH (sec. con núm. de ident.:68)

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCTCCTCCGTGA
5 AAGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTACCAGATCCACCATGCACTGGGTC
AAGCAGGCCCTGGACAAGGCTTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCCAGCTCC
GCCTACACCAACTACAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACA
AGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGC
CGTGTACTACTGCGCCTCTCCTCAGGTTCACTACGACTACGCCGGCTTTCCTTATT
10 GGGGCTGTGGCACCCCTGGTCACCGTTTCTTCT

Secuencia de ADN que codifica VL (sec. con núm. de ident.:69)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGTGCTTCTCCAGGCGAGAGAG
TGACCCTGTCCTGCTCCGCTTCCTCCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAG
AAGCCCGGCTGCGCCCCTAGAAGATGGATCTACGACTCCTCCAAGCTGGCCTCTG
15 GCGTGCCTGCTAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCAGAGACTATACCCTGACAATC
TCCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCTAGGA
ACCCTCCTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

Secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de spFv (VL-
Enlazador-VH) de CD3B2030-N106A (sec. con núm. de ident.: 70)

20 GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGTGCTTCTCCAGGCGAGAGAGT
GACCCTGTCCTGCTCCGCTTCCTCCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGA
AGCCCGGCTGCGCCCCTAGAAGATGGATCTACGACTCCTCCAAGCTGGCCTCTGG
CGTGCCTGCTAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCAGAGACTATACCCTGACAATCT
CCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCTAGGAAC

CCTCCTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGGCGGAGGTTCTGGTG
 GATCTGGCGGATGTCCTCCTTGTGGTGAAGCGGCGGACAGGTTTACAGCTGGTTCA
 GTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCTCCTCCGTGAAAGTGTCTGCAAGGCTT
 CCGGCTACACCTTTACCAGATCCACCATGCACTGGGTCAAGCAGGCCCTGGACAA
 5 GGCTTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCCAGCTCCGCCTACACCAACTACAACCA
 GAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTACA
 TGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCTCCT
 CAGGTTCACTACGACTACGCCGGCTTTCTTATTGGGGCTGTGGCACCTGGTCAC
 CGTTTCTTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
 10 CACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGA
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 15 GTGTCGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
 GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
 20 CAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

Diseño por ingeniería de Fc

En algunas modalidades, los CD3 spFv de la descripción se conjugan con una región constante de Ig o un fragmento de la región constante de Ig para impartir propiedades similares a anticuerpos, incluidas funciones efectoras de Fc que se unen a C1q, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés), unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), fagocitosis o regulación a la baja de los receptores de superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR). En algunas modalidades, los CD3 spFv de la descripción se usan para elaborar una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión comprende los CD3 spFv y una región constante de Ig o un fragmento de la región constante de Ig para impartir propiedades similares a anticuerpos, incluidas funciones efectoras de Fc que se unen a C1q, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis o regulación a la baja 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. El CD3 spFv puede 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
5 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 se elimina de la región constante de Ig por carboxipeptidasas circulantes endógenas en el torrente sanguíneo (Cai et al., (2011) Biotechnol Bioeng 108:404-412). En algunas modalidades, durante la elaboración, la eliminación de CTL puede controlarse a menos
10 del nivel máximo mediante el control de la concentración de Zn^{2+} , EDTA o EDTA – Fe^{3+} extracelular, tal como se describe en la publicación de la patente de los EE. UU. núm. 20140273092. El contenido de CTL de las proteínas puede medirse por métodos conocidos.

En otras modalidades, el CD3 spFv fusionado con la región constante de Ig tiene
15 un contenido de lisina de C-terminal 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 %.
20 En otras modalidades, el contenido de lisina C-terminal es de aproximadamente 60 %.

La presente descripción también proporciona un CD3 spFv fusionado o conjugado con una región constante de inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la región constante de 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.

- 5 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, la CD3 spFv se fusiona o conjuga con el N-terminal de la región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig. En algunas modalidades, la CD3 spFv se fusiona o conjuga con el C-terminal de la región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig. En algunas modalidades, la CD3 spFv se fusiona conjuga con la región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig a través de un segundo enlazador.

El CD3 spFv de la descripción fusionado o conjugado con la región constante de Ig o el fragmento de la región constante de Ig pueden evaluarse para determinar su funcionalidad usando diversos ensayos conocidos. La unión a CD3 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.

La ADCC puede evaluarse usando un ensayo in vitro usando células NK como células efectoras. La citólisis puede detectarse por la liberación de etiqueta (p. ej., sustratos radioactivos, colorantes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. En un ensayo ilustrativo, se usan células diana con una relación de

5 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

10 espontánea de BATDA de las células diana en ausencia de cualquier anticuerpo.

La ADCP puede evaluarse usando macrófagos derivados de monocitos como células efectoras y células diana que se diseñan por ingeniería 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

15 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 una etiqueta fluorescente, y el porcentaje de fagocitosis puede determinarse basado en el % de fluorescencia GFP en los macrófagos CD11+CD14+ usando métodos estándar.

20 La CDC de células puede medirse, por ejemplo, al sembrar en placas de células Daudi a 1×10^5 células/pocillo (50 μ l/pocillo) en RPMI-B (RPMI complementado con BSA al 1 %), añadir 50 μ l de proteína de prueba a los pocillos a una concentración final entre 0-100 μ g/ml, incubar de la reacción durante 15 min a temperatura ambiente, añadir 11 μ l de suero humano combinado 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-CD3 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 epítipo 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 “epítipo de unión al receptor de rescate” se refiere a un epítipo

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 Ig o el fragmento de la región constante de Ig comprende al menos una mutación que modula una vida media del CD3 spFv. En algunas modalidades, la al menos una mutación que modula la vida media del CD3 spFv 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 CD3 spFv comprende una primera región constante de Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de Ig o un fragmento de esta. En algunas modalidades, una o ambas de la primera región constante de Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de Ig o un fragmento de esta comprenden al menos una mutación que modula una vida media del CD3 spFv 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 spFv de CD3 a un FcγR.

En algunas modalidades, la al menos una mutación que resulta en la unión reducida del CD3 spFv 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-eliminada/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-eliminada/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos
 es de acuerdo con el índice EU. En algunas modalidades, el CD3 spFv comprende una
 5 primera región constante de Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de
 Ig o un fragmento de esta. En algunas modalidades, una o ambas de la primera región
 constante de Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de Ig o un
 fragmento de esta comprende al menos una mutación que modula una vida media del
 CD3 spFv seleccionado independientemente del grupo que consiste en F234A/L235A,
 10 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-eliminada/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
 15 S228P/F234A/L235A/G236-eliminada/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos
 es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, la región constante de Ig o el fragmento de la región
 constante de Ig comprende al menos una mutación que resulta en la unión potenciada
 del CD3 spFv a un FcγR.

20 En algunas modalidades, la al menos una mutación que resulta en la unión
 potenciada del CD3 spFv 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 CD3 spFv comprende una primera región constante de Ig o un fragmento de esta y una segunda región constante de Ig o un fragmento de esta. En algunas modalidades, una o ambas de la primera región constante de Ig o un fragmento de esta y una segunda
 5 región constante de Ig o un fragmento de esta comprenden al menos una mutación que modula una vida media del CD3 spFv 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.

10 En algunas modalidades, el agente de unión comprende al menos una mutación en un dominio CH3 de una 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 una 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
 15 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,
 20 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.

Agentes aglutinantes alternativos

La presente descripción abarca agentes de unión que no son inmunoglobulinas que comprenden el CD3 spFv descrito en la presente. 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 3. 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 supercántigos adecuados pueden incluir, por ejemplo, adnectinas o monocuerpos, basados en el décimo dominio extracelular de fibronectina humana III (ver, p. ej., Koide y 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); afillinas, basadas en γ -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 y 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.

Proteínas de unión multiespecíficas

20

En un aspecto de la presente, los CD3 spFv descritos en la presente se incorporan a moléculas de unión multiespecíficas (p. ej., biespecíficas o triespecíficas) que pueden unirse a uno o más de otros antígenos además de CD3.

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 y Cuello, 1983, Nature 305:537-40). Para obtener más
5 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 trispecífica. En algunas modalidades, la proteína multiespecífica es tetraespecífica.

10 En modalidades específicas, los agentes de unión 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
15 de las especificidades de unión es para CD3 y la otra es para cualquier otro antígeno. En algunas modalidades, una de las especificidades de unión es para CD3, y la otra es para un antígeno de superficie expresado en células. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (p. ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

20 En otras modalidades, la proteína multiespecífica es monovalente para unirse a CD3. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es bivalente para unirse a CD3. 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 CD3, y es monovalente para la unión al segundo antígeno.

En otras modalidades, la proteína multiespecífica es bivalente para la unión a CD3, y es monovalente para la unión al segundo antígeno. En otras modalidades, la proteína

multiespecífica es monovalente para la unión a CD3, y es bivalente para la unión al

5 segundo antígeno. En otras modalidades, la proteína multiespecífica es bivalente para la unión a CD3, y es bivalente para la unión al segundo antígeno.

En otras modalidades, el dominio de unión al antígeno que se une al segundo antígeno se selecciona de un scFv, un spFv, un (scFv)₂, un Fv, un Fab, un F(ab')₂, un Fd, un dAb o un VHH. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al

10 antígeno que se une al antígeno comprende un Fab. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno comprende un F(ab')₂.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno comprende un VHH. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno comprende un Fv. En algunas modalidades, el

15 segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno comprende un Fd. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno comprende un scFv. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno comprende un spFv.

En algunas modalidades, comprende un se fusiona o conjuga con una primera

20 región constante de inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la primera región constante de Ig y/o el segundo dominio de unión al antígeno que se une al antígeno tumoral se fusiona o conjuga con una segunda región constante de inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la segunda región constante de 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 CD3 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, 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

5 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,

10 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

15 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

20 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.

Pueden generarse anticuerpos biespecíficos en toda su extensión, por ejemplo, usando el intercambio de brazos Fab (o intercambio de medias moléculas) entre dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos al introducir sustituciones en la interfaz 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 usando 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 epítipo distinto, es decir, un epítipo en un antígeno diana de interés y un epítipo 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-oyal. 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 y un ojal 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
 5 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
 10 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

15 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,

20 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 impulsar el ensamblaje de heterodímeros a partir 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 Publicación de patente PCT. internacional núm. WO 2011/131746.

En algunas modalidades descritas en la presente, el agente de unión a CD3 biespecífico descrito en la presente comprende una primera región de unión que se une a CD3 spFv 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.

5 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
10 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,
15 regiones Fc o partes de estas; moléculas de fusión a Fab, en donde diferentes fragmentos de Fab se fusionan juntos; anticuerpos basados en 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
20 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 de Fc pueden incluir fusiones

- 5 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

- 10 F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotechnol) 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),
- 15 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 y al., (2015)
- 20 Drug Discovery Today 20 (5):588-594.

Proteínas de unión biespecíficas spFv CD3

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico spFv CD3 incluye un primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés incluye una VH y una VL; y el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 comprende una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la Tabla 3 y un Enlazador de la Tabla 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico spFv CD3 incluye un primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés incluye una VH y una VL; y el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 comprende una VH de la sec. con núm. de ident.: 28 y una VL de la sec. con núm. de ident.: 29.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico spFv CD3 incluye un primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno tumoral de interés incluye una VH y una VL; y el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 comprende una VH de la sec. con núm. de ident.: 28 y una VL de la sec. con núm. de ident.: 29 y un Enlazador de la Tabla 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico spFv CD3 incluye un primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el primer

dominio variable que se une específicamente a un antígeno tumoral de interés incluye una VH y una VL; y el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye una spFv de la sec. con núm. de ident.:30.

5 Como se describe en la presente, cualquier antígeno distinto de CD3 puede seleccionarse como el segundo objetivo del antígeno para el presente agente de unión CD3 multiespecífico. En modalidades específicas, el agente de unión multiespecífico es una proteína de unión multiespecífica.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico de CD3 de spFv usado en el método de tratamiento de la descripción incluye anticuerpos que se unen
10 específicamente a CD3 y uno o más antígenos diana adicionales. Los antígenos diana ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, antígenos bacterianos, antígenos virales, antígenos tumorales, antígenos asociados con una enfermedad o trastorno autoinmune, y antígenos asociados con una enfermedad o trastorno inflamatorio.

En una modalidad, uno o más antígenos adicionales son antígenos tumorales.
15 Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, antígeno de membrana prostática específica (PSMA, por sus siglas en inglés) y el miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP3), claudin y GUCY2C.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS PSMA x CD3 ESTABILIZADOS

20 “PSMA” se refiere al antígeno prostático específico de membrana. El dominio extracelular abarca los residuos 44-750 del PSMA de longitud completa. Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas de la presente descripción pretenden referirse a la versión humana de los respectivos proteína, polipéptido o fragmento de proteína a menos que se especifiquen explícitamente como

provenientes de una especie no humana. Por lo tanto, “PSMA” significa PSMA humano a menos que se especifique que proviene de una especie no humana, p. ej., “PSMA de ratón” o “PSMA de mono” etc.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo PSMAxCD3 que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a PSMA y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a PSMA o el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo PSMAxCD3 que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a PSMA y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a PSMA es un Fab y en donde el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-terminal al C-terminal, una VL que comprende una VL cisteína, un Enlazador de la Tabla 2 y una VH que comprende una VH cisteína (VL-Enlazador-VH).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo PSMAxCD3 que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a PSMA y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a PSMA es un Fab y en donde el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-terminal al C-terminal, una VH que comprende, que consiste en y/o que consiste

esencialmente en una VH cisteína, un Enlazador de la Tabla 2 y una VL que comprende una VL cisteína (VH-Enlazador-VL).

Cualquier molécula de unión a PSMA puede incorporarse en una molécula de unión biespecífica de la descripción.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo PSMAxCD3 que tiene un primer dominio variable que se une específicamente a PSMA y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye una VH de la sec. con núm. de ident.: 28 y una VL de la sec. con núm. de ident.: 29 y un Enlazador de la
10 Tabla 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo PSMAxCD3 que incluye un primer dominio variable que se une específicamente a PSMA, y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye un spFv de la
15 sec. con núm. de ident.: 30.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ENPP3 x CD3 ESTABILIZADOS

El ENPP3 (CD203c) es un miembro de la familia ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP, por sus siglas en inglés) de superficie celular que
20 consta de 7 moléculas estructuralmente relacionadas con actividades ATPasa y ATP pirofosfatasa implicadas en la hidrólisis de nucleótidos extracelulares (Stefan et al., 2005, Trends Biochem Sci, 30(10):542-550). El ENPP3 es una proteína transmembrana tipo II de paso único de 150 kDa, con una región extracelular que contiene un dominio tipo

nucleasa, un dominio catalítico y un dominio tipo B somatomedina (Borza et al., 2022, J Biol Chem, 298(2):101526; Hausmann et al., 2013, Adv Biol Regul, 53(1):112-117).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo ENPP3xCD3 que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a PSMA y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a PSMA o el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo ENPP3xCD3 que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a ENPP3 y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a ENPP3 es un Fab y en donde el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-terminal al C-terminal, una VL que comprende una VL cisteína, un enlazador de la Tabla 2 y una VH que comprende una VH cisteína (VL-Enlazador-VH).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo ENPP3xCD3 que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a ENPP3 y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a ENPP3 es un Fab y en donde el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-terminal al C-terminal, una VH que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en una VH cisteína, un enlazador de la Tabla 2 y una VL que comprende una VL cisteína (VH-Enlazador-VL).

Cualquier molécula de unión a ENPP3 puede incorporarse en una molécula de unión biespecífica de la descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo ENPP3xCD3 que tiene un primer dominio variable que se une específicamente a ENPP3 y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye una VH de la sec. con núm. de ident.: 28 y una VL de la sec. con núm. de ident.: 29 y un enlazador de la Tabla 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo ENPP3xCD3 que incluye un primer dominio variable que se une específicamente a ENPP3 y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye un spFv de la sec. con núm. de ident.: 30.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS CLAUDINA x CD3 ESTABILIZADOS

Claudin 18.2 (CLDN18.2) es una proteína de unión estrecha de dominio 4-transmembrana que juega un papel en la adhesión célula-célula y la regulación del transporte de iones paracelulares en el epitelio gástrico. En tejidos normales, la expresión de CLDN18.2 se confina estrictamente a células epiteliales diferenciadas de la mucosa gástrica. CLDN18.2 se expresa altamente en cánceres del sistema digestivo incluyendo adenocarcinomas gástricos y pancreáticos, tumores de unión gastroesofágica (GEJ, por sus siglas en inglés), adenocarcinomas esofágicos y lesiones metastásicas.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo CLDN18.2xCD3 que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a CLDN18.2 y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a GUCY2C o el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo CLDN18.2xCD3 que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a CLDN18.2 y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a CLDN18.2 es un Fab y en donde el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-terminal al C-terminal, una VL que comprende una VL cisteína, un enlazador de la Tabla 2 y una VH que comprende una VH cisteína (VL-Enlazador-VH).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo CLDN18.2xCD3 que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a CLDN18.2 y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a CLDN18.2 es un Fab y en donde el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-terminal al C-terminal, una VH que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en una VH cisteína, un enlazador de la Tabla 2 y una VL que comprende una VL cisteína (VH-Enlazador-VL).

Cualquier molécula de unión a CLDN18.2 puede incorporarse en una molécula de unión biespecífica de la descripción.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo CLDN18.2xCD3 que tiene un primer dominio variable que se une específicamente a CLDN18.2 y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye una VH de la sec. con núm. de ident.: 28 y una VL de la sec. con núm. de ident.: 29 y un enlazador de la Tabla 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo CLDN18.2xCD3 incluye un primer dominio variable que se une específicamente a CLDN18.2 y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye un spFv de la sec. con núm. de ident.: 30.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS GUCY2C x CD3 ESTABILIZADOS

“GUCY2C” se refiere a guanilato ciclasa 2C, también conocido como guanililciclase C (GC-C), guanilato ciclasa intestinal, receptor guanilato ciclasa-C, o el receptor de enterotoxina termoestable (hSTAR). GUCY2C es una enzima que se encuentra en el aspecto luminal del epitelio intestinal y las neuronas de dopamina en el cerebro.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo GUCY2CxCD3 que comprende, consiste en y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a GUCY2C y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a GUCY2C o el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo GUCY2CxCD3 que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a GUCY2C y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a GUCY2C es un Fab y en donde
 5 el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-terminal al C-terminal, una VL que comprende una VL cisteína, un enlazador de la Tabla 2 y una VH que comprende una VH cisteína (VL-Enlazador-VH).

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo
 10 GUCY2CxCD3 que comprende, consiste y/o consiste esencialmente en un primer dominio variable que se une a GUCY2C y un segundo dominio variable que se une a CD3, en donde el primer dominio variable que se une a GUCY2C es un Fab y en donde el segundo dominio variable que se une a CD3 es un scFv estabilizado con disulfuro (spFv) que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en desde el N-
 15 terminal al C-terminal, una VH que comprende, que consiste en y/o que consiste esencialmente en una VH cisteína, un enlazador de la Tabla 2 y una VL que comprende una VL cisteína (VH-Enlazador-VL).

Cualquier molécula de unión a GUCY2C puede incorporarse en una molécula de unión biespecífica de la descripción.

20 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo GUCY2CxCD3 que tiene un primer dominio variable que se une específicamente a GUCY2C y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye una VH de la

sec. con núm. de ident.: 28 y una VL de la sec. con núm. de ident.: 29 y un enlazador de la Tabla 2.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo GUCY2CxCD3 que incluye un primer dominio variable que se une específicamente a GUCY2C, y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye un spFv de la sec. con núm. de ident.: 30.

VARIANTES DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPO CD3

La descripción también abarca variantes de las moléculas de unión a CD3 de spFv y anticuerpos biespecíficos que comprenden las moléculas de unión a CD3 de spFv descritas anteriormente.

El término “variantes” se refiere a anticuerpos que comprenden una o más mutaciones, sustituciones, deleciones y/o adiciones de uno o más residuos de aminoácidos. Tal adición, sustitución o delección puede ubicarse en cualquier posición en la molécula. En el caso donde se han agregado, sustituido o eliminado varios aminoácidos, se puede considerar cualquier combinación de adición, sustitución o delección, siempre que el anticuerpo resultante todavía tenga al menos las propiedades ventajosas del anticuerpo de la invención.

Las secuencias de los anticuerpos spFv CD3 pueden comprender secuencias de aminoácidos con al menos 80 % de identidad u homología con las secuencias descritas anteriormente. En algunas modalidades, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente el 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con los dominios de

unión al antígeno que se unen a CD3 descrito anteriormente. El uso de variantes de los dominios de unión al antígeno que se unen a CD3 incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 sustituciones de aminoácidos en el dominio de unión al antígeno que se une a CD3, que se encuentran dentro del alcance de la descripción, siempre que retengan o hayan mejorado las propiedades funcionales en comparación con los dominios de unión al antígeno principales.

Las variantes de los dominios de unión al antígeno que se unen a CD3 incluyen una o más deleciones y/o adiciones de uno o más residuos de aminoácidos. Tal adición, sustitución o delección puede ubicarse en cualquier posición en la molécula. En el caso donde se han agregado, sustituido o eliminado varios aminoácidos, se puede considerar cualquier combinación de adición, sustitución o delección, siempre que el anticuerpo resultante todavía tenga al menos las propiedades ventajosas del anticuerpo de la invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico spFv CD3 incluye un primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye una VH que es al menos 80 % idéntica a la VH de la sec. con núm. de ident.: 28 y una VL que es al menos 80 % idéntica a la VL de la sec. con núm. de ident.: 29.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico para spFv CD3 incluye un primer dominio variable que se une específicamente a un antígeno diana de interés y un segundo dominio variable que se une específicamente a CD3, en donde el segundo

dominio variable que se une específicamente a CD3 incluye un spFv que es al menos 80 % idéntico al spFv de la sec. con núm. de ident.: 30.

Los términos “idéntico” o “identidad” porcentual, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas (p. ej., anticuerpos spFv CD3 y

5 polinucleótidos que los codifican), 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 para una máxima correspondencia, como se midió usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. El porcentaje (%) de

10 identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia dada que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia. El porcentaje (%) de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad =

15 número de posiciones idénticas/número total de posiciones $\times 100$), teniendo en cuenta el número de interrupciones y la longitud de cada interrupción, que se necesita introducir para lograr la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando diversos de los algoritmos que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, usando un

20 software disponible públicamente tal como BLAS, BLAST-2, ALIGN. La megalina (DNASTAR) o el programa GAP disponible en el paquete de software GCG.

Un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren únicamente por las sustituciones conservadoras. Los anticuerpos de la presente descripción también

incluyen aquellos para los cuales se han mejorado las características de unión, las propiedades funcionales o físicas mediante mutaciones directas. En algunas modalidades, los dominios de unión al antígeno variantes que se unen a CD3 comprenden una o dos sustituciones conservadoras en cualquiera de las regiones CDR, mientras retienen las propiedades funcionales deseadas del anticuerpo parental que se une a CD3.

“Modificaciones conservadoras” se refiere a las modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene las modificaciones de aminoácidos. Las modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que el aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares están bien definidas e incluyen aminoácidos con cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina, triptófano), cadenas laterales aromáticas (p. ej., fenilalanina, triptófano, histidina, tirosina), cadenas laterales alifáticas (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), amida (p. ej., asparagina, glutamina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales que contienen azufre (cisteína, metionina). Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido puede sustituirse además con alanina, como se ha descrito previamente para la mutagénesis por barrido de alanina (MacLennan et al., (1988) Acta Physiol

Scand Suppl 643:55-67; Sasaki et al., (1988) Adv Biophys 35:1-24). Las sustituciones de aminoácidos para los anticuerpos de la solicitud pueden elaborarse por métodos conocidos, por ejemplo, mediante mutagénesis por PCR (Patente de los EE. UU. núm. 4.683.195).

5 Alternativamente, las genotecas de variantes pueden generarse, por ejemplo, usando codones aleatorios (NNK) o no aleatorios, por ejemplo, codones DVK, que codifican 11 aminoácidos (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Pueden probarse las características de las variantes resultantes usando ensayos descritos en la presente.

10

POLINUCLEÓTIDOS, VECTORES, Y CÉLULAS HUÉSPED

También se describen polinucleótidos aislados que codifican las moléculas de unión a spFv CD3 de la descripción. Los polinucleótidos aislados capaces de codificar las moléculas de unión a spFv CD3 de la presente pueden incluirse en los mismos, o
15 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
20 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

5 al menos una proteína recombinante que puede unirse operativamente a elementos regulatorios adecuados. Tales elementos regulatorios pueden incluir un promotor transcripcional, secuencias que codifican sitios de unión ribosomales adecuados de ARNm, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

Los vectores de expresión, especialmente los vectores de expresión de mamíferos,

10 puede incluir, además, uno o más elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuado unido al gen a expresar, otras secuencias flanqueantes 5' o 3' sin transcribir, secuencias 5' o 3' sin transcribir (tales como los sitios necesarios de unión a ribosoma), un sitio de poliadenilación, sitios de corte donantes y aceptores, o secuencias de terminación transcripcional. También

15 puede incorporarse un origen de replicación que confiere la capacidad de replicarse en un huésped.

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

20 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, los vectores pueden usarse para generar moléculas de unión a spFv CD3 biespecíficas de la descripción. 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.

5 **MÉTODOS DE TRATAMIENTO**

Se proporcionan en la presente métodos para tratar a un sujeto con una enfermedad o trastorno al administrar al sujeto al menos una cantidad efectiva de una molécula de unión que comprende la molécula de unión a spFv CD3, anticuerpo que comprende la molécula de unión a spFv CD3 o una variante de una molécula de unión a spFv CD3 o cualquier composición farmacéutica de estas. En algunas modalidades, la molécula de unión comprende un anticuerpo biespecífico que comprende un brazo de unión a spFv CD3 y un brazo de unión al antígeno. En algunas modalidades, el brazo de unión al antígeno es específico para unirse a un antígeno asociado con la enfermedad o trastorno que se está tratando.

“Tratar”, “que trata” o “tratamiento”, como se usa en la presente, incluyen aliviar, disminuir o mejorar al menos un síntoma de una enfermedad o afección, prevenir síntomas adicionales, inhibir la enfermedad o afección, p. ej., detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, causar la regresión de la enfermedad o afección, demorar el progreso de la afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección o detener los síntomas de la enfermedad o afección ya sea profiláctica y/o terapéuticamente.

Como se usa en la presente descripción, los términos “cantidad efectiva” se refieren a una cantidad suficiente para lograr una concentración de compuesto que sea capaz de tratar una enfermedad o afección. Dichas dosificaciones pueden determinarse

por los expertos en la técnica. La cantidad del anticuerpo de la presente invención realmente administrada típicamente será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluida la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso, y respuesta del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y lo similar. Los expertos en la técnica también apreciarán que la dosis puede depender de la estabilidad del anticuerpo administrado.

Una cantidad efectiva puede variar dependiendo de factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, la condición física del sujeto, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si corresponde), las formulaciones específicas empleadas, la estructura del anticuerpo o de sus variantes y la capacidad de un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva del anticuerpo administrado puede depender del tipo y la gravedad de la enfermedad que se está tratando y de la vía de administración del polipolipéptido de anticuerpo o de la composición farmacéutica del anticuerpo.

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 %, 93-97 %, 94-96 %, 95-95 %, 96-96 %, 97-97 %, 98-98 %, 99-99 %, 100-100 %, 90-90 %, 91-91 %, 92-92 %, 93-93 %, 94-94 %, 95-95 %, 96-96 %, 97-97 %, 98-98 %, 99-99 %, 100-100 %, 90-91 %, 91-92 %, 92-93 %, 93-94 %, 94-95 %, 95-96 %, 96-97 %, 97-98 %, 98-99 %, 99-100 %, 90-92 %, 92-94 %, 94-96 %, 96-98 %, 98-100 %, 90-94 %, 94-98 %, 98-100 %, 90-96 %, 96-100 %, 90-98 %, 98-100 %, 90-100 %, 91-100 %, 92-100 %, 93-100 %, 94-100 %, 95-100 %, 96-100 %, 97-100 %, 98-100 %, 99-100 %, 100-90 %, 100-91 %, 100-92 %, 100-93 %, 100-94 %, 100-95 %, 100-96 %, 100-97 %, 100-98 %, 100-99 %, 100-100 %, 90-90.1 %, 90.1-90.2 %, 90.2-90.3 %, 90.3-90.4 %, 90.4-90.5 %, 90.5-90.6 %, 90.6-90.7 %, 90.7-90.8 %, 90.8-90.9 %, 90.9-91.0 %, 91.0-91.1 %, 91.1-91.2 %, 91.2-91.3 %, 91.3-91.4 %, 91.4-91.5 %, 91.5-91.6 %, 91.6-91.7 %, 91.7-91.8 %, 91.8-91.9 %, 91.9-92.0 %, 92.0-92.1 %, 92.1-92.2 %, 92.2-92.3 %, 92.3-92.4 %, 92.4-92.5 %, 92.5-92.6 %, 92.6-92.7 %, 92.7-92.8 %, 92.8-92.9 %, 92.9-93.0 %, 93.0-93.1 %, 93.1-93.2 %, 93.2-93.3 %, 93.3-93.4 %, 93.4-93.5 %, 93.5-93.6 %, 93.6-93.7 %, 93.7-93.8 %, 93.8-93.9 %, 93.9-94.0 %, 94.0-94.1 %, 94.1-94.2 %, 94.2-94.3 %, 94.3-94.4 %, 94.4-94.5 %, 94.5-94.6 %, 94.6-94.7 %, 94.7-94.8 %, 94.8-94.9 %, 94.9-95.0 %, 95.0-95.1 %, 95.1-95.2 %, 95.2-95.3 %, 95.3-95.4 %, 95.4-95.5 %, 95.5-95.6 %, 95.6-95.7 %, 95.7-95.8 %, 95.8-95.9 %, 95.9-96.0 %, 96.0-96.1 %, 96.1-96.2 %, 96.2-96.3 %, 96.3-96.4 %, 96.4-96.5 %, 96.5-96.6 %, 96.6-96.7 %, 96.7-96.8 %, 96.8-96.9 %, 96.9-97.0 %, 97.0-97.1 %, 97.1-97.2 %, 97.2-97.3 %, 97.3-97.4 %, 97.4-97.5 %, 97.5-97.6 %, 97.6-97.7 %, 97.7-97.8 %, 97.8-97.9 %, 97.9-98.0 %, 98.0-98.1 %, 98.1-98.2 %, 98.2-98.3 %, 98.3-98.4 %, 98.4-98.5 %, 98.5-98.6 %, 98.6-98.7 %, 98.7-98.8 %, 98.8-98.9 %, 98.9-99.0 %, 99.0-99.1 %, 99.1-99.2 %, 99.2-99.3 %, 99.3-99.4 %, 99.4-99.5 %, 99.5-99.6 %, 99.6-99.7 %, 99.7-99.8 %, 99.8-99.9 %, 99.9-100.0 %, 100.0-100.1 %, 100.1-100.2 %, 100.2-100.3 %, 100.3-100.4 %, 100.4-100.5 %, 100.5-100.6 %, 100.6-100.7 %, 100.7-100.8 %, 100.8-100.9 %, 100.9-101.0 %, 101.0-101.1 %, 101.1-101.2 %, 101.2-101.3 %, 101.3-101.4 %, 101.4-101.5 %, 101.5-101.6 %, 101.6-101.7 %, 101.7-101.8 %, 101.8-101.9 %, 101.9-102.0 %, 102.0-102.1 %, 102.1-102.2 %, 102.2-102.3 %, 102.3-102.4 %, 102.4-102.5 %, 102.5-102.6 %, 102.6-102.7 %, 102.7-102.8 %, 102.8-102.9 %, 102.9-103.0 %, 103.0-103.1 %, 103.1-103.2 %, 103.2-103.3 %, 103.3-103.4 %, 103.4-103.5 %, 103.5-103.6 %, 103.6-103.7 %, 103.7-103.8 %, 103.8-103.9 %, 103.9-104.0 %, 104.0-104.1 %, 104.1-104.2 %, 104.2-104.3 %, 104.3-104.4 %, 104.4-104.5 %, 104.5-104.6 %, 104.6-104.7 %, 104.7-104.8 %, 104.8-104.9 %, 104.9-105.0 %, 105.0-105.1 %, 105.1-105.2 %, 105.2-105.3 %, 105.3-105.4 %, 105.4-105.5 %, 105.5-105.6 %, 105.6-105.7 %, 105.7-105.8 %, 105.8-105.9 %, 105.9-106.0 %, 106.0-106.1 %, 106.1-106.2 %, 106.2-106.3 %, 106.3-106.4 %, 106.4-106.5 %, 106.5-106.6 %, 106.6-106.7 %, 106.7-106.8 %, 106.8-106.9 %, 106.9-107.0 %, 107.0-107.1 %, 107.1-107.2 %, 107.2-107.3 %, 107.3-107.4 %, 107.4-107.5 %, 107.5-107.6 %, 107.6-107.7 %, 107.7-107.8 %, 107.8-107.9 %, 107.9-108.0 %, 108.0-108.1 %, 108.1-108.2 %, 108.2-108.3 %, 108.3-108.4 %, 108.4-108.5 %, 108.5-108.6 %, 108.6-108.7 %, 108.7-108.8 %, 108.8-108.9 %, 108.9-109.0 %, 109.0-109.1 %, 109.1-109.2 %, 109.2-109.3 %, 109.3-109.4 %, 109.4-109.5 %, 109.5-109.6 %, 109.6-109.7 %, 109.7-109.8 %, 109.8-109.9 %, 109.9-110.0 %, 110.0-110.1 %, 110.1-110.2 %, 110.2-110.3 %, 110.3-110.4 %, 110.4-110.5 %, 110.5-110.6 %, 110.6-110.7 %, 110.7-110.8 %, 110.8-110.9 %, 110.9-111.0 %, 111.0-111.1 %, 111.1-111.2 %, 111.2-111.3 %, 111.3-111.4 %, 111.4-111.5 %, 111.5-111.6 %, 111.6-111.7 %, 111.7-111.8 %, 111.8-111.9 %, 111.9-112.0 %, 112.0-112.1 %, 112.1-112.2 %, 112.2-112.3 %, 112.3-112.4 %, 112.4-112.5 %, 112.5-112.6 %, 112.6-112.7 %, 112.7-112.8 %, 112.8-112.9 %, 112.9-113.0 %, 113.0-113.1 %, 113.1-113.2 %, 113.2-113.3 %, 113.3-113.4 %, 113.4-113.5 %, 113.5-113.6 %, 113.6-113.7 %, 113.7-113.8 %, 113.8-113.9 %, 113.9-114.0 %, 114.0-114.1 %, 114.1-114.2 %, 114.2-114.3 %, 114.3-114.4 %, 114.4-114.5 %, 114.5-114.6 %, 114.6-114.7 %, 114.7-114.8 %, 114.8-114.9 %, 114.9-115.0 %, 115.0-115.1 %, 115.1-115.2 %, 115.2-115.3 %, 115.3-115.4 %, 115.4-115.5 %, 115.5-115.6 %, 115.6-115.7 %, 115.7-115.8 %, 115.8-115.9 %, 115.9-116.0 %, 116.0-116.1 %, 116.1-116.2 %, 116.2-116.3 %, 116.3-116.4 %, 116.4-116.5 %, 116.5-116.6 %, 116.6-116.7 %, 116.7-116.8 %, 116.8-116.9 %, 116.9-117.0 %, 117.0-117.1 %, 117.1-117.2 %, 117.2-117.3 %, 117.3-117.4 %, 117.4-117.5 %, 117.5-117.6 %, 117.6-117.7 %, 117.7-117.8 %, 117.8-117.9 %, 117.9-118.0 %, 118.0-118.1 %, 118.1-118.2 %, 118.2-118.3 %, 118.3-118.4 %, 118.4-118.5 %, 118.5-118.6 %, 118.6-118.7 %, 118.7-118.8 %, 118.8-118.9 %, 118.9-119.0 %, 119.0-119.1 %, 119.1-119.2 %, 119.2-119.3 %, 119.3-119.4 %, 119.4-119.5 %, 119.5-119.6 %, 119.6-119.7 %, 119.7-119.8 %, 119.8-119.9 %, 119.9-120.0 %, 120.0-120.1 %, 120.1-120.2 %, 120.2-120.3 %, 120.3-120.4 %, 120.4-120.5 %, 120.5-120.6 %, 120.6-120.7 %, 120.7-120.8 %, 120.8-120.9 %, 120.9-121.0 %, 121.0-121.1 %, 121.1-121.2 %, 121.2-121.3 %, 121.3-121.4 %, 121.4-121.5 %, 121.5-121.6 %, 121.6-121.7 %, 121.7-121.8 %, 121.8-121.9 %, 121.9-122.0 %, 122.0-122.1 %, 122.1-122.2 %, 122.2-122.3 %, 122.3-122.4 %, 122.4-122.5 %, 122.5-122.6 %, 122.6-122.7 %, 122.7-122.8 %, 122.8-122.9 %, 122.9-123.0 %, 123.0-123.1 %, 123.1-123.2 %, 123.2-123.3 %, 123.3-123.4 %, 123.4-123.5 %, 123.5-123.6 %, 123.6-123.7 %, 123.7-123.8 %, 123.8-123.9 %, 123.9-124.0 %, 124.0-124.1 %, 124.1-124.2 %, 124.2-124.3 %, 124.3-124.4 %, 124.4-124.5 %, 124.5-124.6 %, 124.6-124.7 %, 124.7-124.8 %, 124.8-124.9 %, 124.9-125.0 %, 125.0-125.1 %, 125.1-125.2 %, 125.2-125.3 %, 125.3-125.4 %, 125.4-125.5 %, 125.5-125.6 %, 125.6-125.7 %, 125.7-125.8 %, 125.8-125.9 %, 125.9-126.0 %, 126.0-126.1 %, 126.1-126.2 %, 126.2-126.3 %, 126.3-126.4 %, 126.4-126.5 %, 126.5-126.6 %, 126.6-126.7 %, 126.7-126.8 %, 126.8-126.9 %, 126.9-127.0 %, 127.0-127.1 %, 127.1-127.2 %, 127.2-127.3 %, 127.3-127.4 %, 127.4-127.5 %, 127.5-127.6 %, 127.6-127.7 %, 127.7-127.8 %, 127.8-127.9 %, 127.9-128.0 %, 128.0-128.1 %, 128.1-128.2 %, 128.2-128.3 %, 128.3-128.4 %, 128.4-128.5 %, 128.5-128.6 %, 128.6-128.7 %, 128.7-128.8 %, 128.8-128.9 %, 128.9-129.0 %, 129.0-129.1 %, 129.1-129.2 %, 129.2-129.3 %, 129.3-129.4 %, 129.4-129.5 %, 129.5-129.6 %, 129.6-129.7 %, 129.7-129.8 %, 129.8-129.9 %, 129.9-130.0 %, 130.0-130.1 %, 130.1-130.2 %, 130.2-130.3 %, 130.3-130.4 %, 130.4-130.5 %, 130.5-130.6 %, 130.6-130.7 %, 130.7-130.8 %, 130.8-130.9 %, 130.9-131.0 %, 131.0-131.1 %, 131.1-131.2 %, 131.2-131.3 %, 131.3-131.4 %, 131.4-131.5 %, 131.5-131.6 %, 131.6-131.7 %, 131.7-131.8 %, 131.8-131.9 %, 131.9-132.0 %, 132.0-132.1 %, 132.1-132.2 %, 132.2-132.3 %, 132.3-132.4 %, 132.4-132.5 %, 132.5-132.6 %, 132.6-132.7 %, 132.7-132.8 %, 132.8-132.9 %, 132.9-133.0 %, 133.0-133.1 %, 133.1-133.2 %, 133.2-133.3 %, 133.3-133.4 %, 133.4-133.5 %, 133.5-133.6 %, 133.6-133.7 %, 133.7-133.8 %, 133.8-133.9 %, 133.9-134.0 %, 134.0-134.1 %, 134.1-134.2 %, 134.2-134.3 %, 134.3-134.4 %, 134.4-134.5 %, 134.5-134.6 %, 134.6-134.7 %, 134.7-134.8 %, 134.8-134.9 %, 134.9-135.0 %, 135.0-135.1 %, 135.1-135.2 %, 135.2-135.3 %, 135.3-135.4 %, 135.4-135.5 %, 135.5-135.6 %, 135.6-135.7 %, 135.7-135.8 %, 135.8-135.9 %, 135.9-136.0 %, 136.0-136.1 %, 136.1-136.2 %, 136.2-136.3 %, 136.3-136.4 %, 136.4-136.5 %, 136.5-136.6 %, 136.6-136.7 %, 136.7-136.8 %, 136.8-136.9 %, 136.9-137.0 %, 137.0-137.1 %, 137.1-137.2 %, 137.2-137.3 %, 137.3-137.4 %, 137.4-137.5 %, 137.5-137.6 %, 137.6-137.7 %, 137.7-137.8 %, 137.8-137.9 %, 137.9-138.0 %, 138.0-138.1 %, 138.1-138.2 %, 138.2-138.3 %, 138.3-138.4 %, 138.4-138.5 %, 138.5-138.6 %, 138.6-138.7 %, 138.7-138.8 %, 138.8-138.9 %, 138.9-139.0 %, 139.0-139.1 %, 139.1-139.2 %, 139.2-139.3 %, 139.3-139.4 %, 139.4-139.5 %, 139.5-139.6 %, 139.6-139.7 %, 139.7-139.8 %, 139.8-139.9 %, 139.9-140.0 %, 140.0-140.1 %, 140.1-140.2 %, 140.2-140.3 %, 140.3-140.4 %, 140.4-140.5 %, 140.5-140.6 %, 140.6-140.7 %, 140.7-140.8 %, 140.8-140.9 %, 140.9-141.0 %, 141.0-141.1 %, 141.1-141.2 %, 141.2-141.3 %, 141.3-141.4 %, 141.4-141.5 %, 141.5-141.6 %, 141.6-141.7 %, 141.7-141.8 %, 141.8-141.9 %, 141.9-142.0 %, 142.0-142.1 %, 142.1-142.2 %, 142.2-142.3 %, 142.3-142.4 %, 142.4-142.5 %, 142.5-142.6 %, 142.6-142.7 %, 142.7-142.8 %, 142.8-142.9 %, 142.9-143.0 %, 143.0-143.1 %, 143.1-143.2 %, 143.2-143.3 %, 143.3-143.4 %, 143.4-143.5 %, 143.5-143.6 %, 143.6-143.7 %, 143.7-143.8 %, 143.8-143.9 %, 143.9-144.0 %, 144.0-144.1 %, 144.1-144.2 %, 144.2-144.3 %, 144.3-144.4 %, 144.4-144.5 %, 144.5-144.6 %, 144.6-144.7 %, 144.7-144.8 %, 144.8-144.9 %, 144.9-145.0 %, 145.0-145.1 %, 145.1-145.2 %, 145.2-145.3 %, 145.3-145.4 %, 145.4-145.5 %, 145.5-145.6 %, 145.6-145.7 %, 145.7-145.8 %, 145.8-145.9 %, 145.9-146.0 %, 146.0-146.1 %, 146.1-146.2 %, 146.2-146.3 %, 146.3-146.4 %, 146.4-146.5 %, 146.5-146.6 %, 146.6-146.7 %, 146.7-146.8 %, 146.8-146.9 %, 146.9-147.0 %, 147.0-147.1 %, 147.1-147.2 %, 147.2-147.3 %, 147.3-147.4 %, 147.4-147.5 %, 147.5-147.6 %, 147.6-147.7 %, 147.7-147.8 %, 147.8-147.9 %, 147.9-148.0 %, 148.0-148.1 %, 148.1-148.2 %, 148.2-148.3 %, 148.3-148.4 %, 148.4-148.5 %, 148.5-148.6 %, 148.6-148.7 %, 148.7-148.8 %, 148.8-148.9 %, 148.9-149.0 %, 149.0-149.1 %, 149.1-149.2 %, 149.2-149.3 %, 149.3-149.4 %, 149.4-149.5 %, 149.5-149.6 %, 149.6-149.7 %, 149.7-149.8 %, 149.8-149.9 %, 149.9-150.0 %, 150.0-150.1 %, 150.1-150.2 %, 150.2-150.3 %, 150.3-150.4 %, 150.4-150.5 %, 150.5-150.6 %, 150.6-150.7 %, 150.7-150.8 %, 150.8-150.9 %, 150.9-151.0 %, 151.0-151.1 %, 151.1-151.2 %, 151.2-151.3 %, 151.3-151.4 %, 151.4-151.5 %, 151.5-151.6 %, 151.6-151.7 %, 151.7-151.8 %, 151.8-151.9 %, 151.9-152.0 %, 152.0-152.1 %, 152.1-152.2 %, 152.2-152.3 %, 152.3-152.4 %, 152.4-152.5 %, 152.5-152.6 %, 152.6-152.7 %, 152.7-152.8 %, 152.8-152.9 %, 152.9-153.0 %, 153.0-153.1 %, 153.1-153.2 %, 153.2-153.3 %, 153.3-153.4 %, 153.4-153.5 %, 153.5-153.6 %, 153.6-153.7 %, 153.7-153.8 %, 153.8-153.9 %, 153.9-154.0 %, 154.0-154.1 %, 154.1-154.2 %, 154.2-154.3 %, 154.3-154.4 %, 154.4-154.5 %, 154.5-154.6 %, 154.6-154.7 %, 154.7-154.8 %, 154.8-154.9 %, 154.9-155.0 %, 155.0-155.1 %, 155.1-155.2 %, 155.2-155.3 %, 155.3-155.4 %, 155.4-155.5 %, 155.5-155.6 %, 155.6-155.7 %, 155.7-155.8 %, 155.8-155.9 %, 155.9-156.0 %, 156.0-156.1 %, 156.1-156.2 %, 156.2-156.3 %, 156.3-156.4 %, 156.4-156.5 %, 156.5-156.6 %, 156.6-156.7 %, 156.7-156.8 %, 156.8-156.9 %, 156.9-157.0 %, 157.0-157.1 %, 157.1-157.2 %, 157.2-157.3 %, 157.3-157.4 %, 157.4-157.5 %, 157.5-157.6 %, 157.6-157.7 %, 157.7-157.8 %, 157.8-157.9 %, 157.9-158.0 %, 158.0-158.1 %, 158.1-158.2 %, 158.2-158.3 %, 158.3-158.4 %, 158.4-158.5 %, 158.5-158.6 %, 158.6-158.7 %, 158.7-158.8 %, 158.8-158.9 %, 158.9-159.0 %, 159.0-159.1 %, 159.1-159.2 %, 159.2-159.3 %, 159.3-159.4 %, 159.4-159.5 %, 159.5-159.6 %, 159.6-159.7 %, 159.7-159.8 %, 159.8-159.9 %, 159.9-160.0 %, 160.0-160.1 %, 160.1-160.2 %, 160.2-160.3 %, 160.3-160.4 %, 160.4-160.5 %, 160.5-160.6 %, 160.6-160.7 %, 160.7-160.8 %, 160.8-160.9 %, 160.9-161.0 %, 161.0-161.1 %, 161.1-161.2 %, 161.2-161.3 %, 161.3-161.4 %, 161.4-161.5 %, 161.5-161.6 %, 161.6-161.7 %, 161.7-161.8 %, 161.8-161.9 %, 161.9-162.0 %, 162.0-162.1 %, 162.1-162.2 %, 162.2-162.3 %, 162.3-162.4 %, 162.4-162.5 %, 162.5-162.6 %, 162.6-162.7 %, 162.7-162.8 %, 162.8-162.9 %, 162.9-163.0 %, 163.0-163.1 %, 163.1-163.2 %, 163.2-163.3 %, 163.3-163.4 %, 163.4-163.5 %, 163.5-163.6 %, 163.6-163.7 %, 163.7-163.8 %, 163.8-163.9 %, 163.9-164.0 %, 164.0-164.1 %, 164.1-164.2 %, 164.2-164.3 %, 164.3-164.4 %, 164.4-164.5 %, 164.5-164.6 %, 164.6-164.7 %, 164.7-164.8 %, 164.8-164.9 %, 164.9-165.0 %, 165.0-165.1 %, 165.1-165.2 %, 165.2-165.3 %, 165.3-165.4 %, 165.4-165.5 %, 165.5-165.6 %, 165.6-165.7 %, 165.7-165.8 %, 165.8-165.9 %, 165.9-166.0 %, 166.0-166.1 %, 166.1-166.2 %, 166.2-166.3 %, 166.3-166.4 %, 166.4-166.5 %, 166.5-166.6 %, 166.6-166.7 %, 166.7-166.8 %, 166.8-166.9 %, 166.9-167.0 %, 167.0-167.1 %, 167.1-167.2 %, 167.2-167.3 %, 167.3-167.4 %, 167.4-167.5 %, 167.5-167.6 %, 167.6-167.7 %, 167.7-167.8 %, 167.8-167.9 %, 167.9-168.0 %, 168.0-168.1 %, 168.1-168.2 %, 168.2-168.3 %, 168.3-168.4 %, 168.4-168.5 %, 168.5-168.6 %, 168.6-168.7 %, 168.7-168.8 %, 168.8-168.9 %, 168.9-169.0 %, 169.0-169.1 %, 169.1-169.2 %, 169.2-169.3 %, 169.3-169.4 %, 169.4-169.5 %, 169.5-169.6 %, 169.6-169.7 %, 169.7-169.8 %, 169.8-169.9 %, 169.9-170.0 %, 170.0-170.1 %, 170.1-170.2 %, 170.2-170.3 %, 170.3-170.4 %, 170.4-170.5 %, 170.5-170.6 %, 170.6-170.7 %, 170.7-170.8 %, 170.8-170.9 %, 170.9-171.0 %, 171.0-171.1 %, 171.1-171.2 %, 171.2-171.3 %, 171.3-171.4 %, 171.4-171.5 %, 171.5-171.6 %, 171.6-171.7 %, 171.7-171.8 %, 171.8-171.9 %, 171.9-172.0 %, 172.0-172.1 %, 172.1-172.2 %, 172.2-172.3 %, 172.3-172.4 %, 172.4-172.5 %, 172.5-172.6 %, 172.6-172.7 %, 172.7-172.8 %, 172.8-172.9 %, 172.9-173.0 %, 173.0-173.1 %, 173.1-173.2 %, 173.2-173.3 %, 173.3-173.4 %, 173.4-173.5 %, 173.5-173.6 %, 173.6-173.7 %, 173.7-173.8 %, 173.8-173.9 %, 173.9-174.0 %, 174.0-174.1 %, 174.1-174.2 %, 174.2-174.3 %, 174.3-174.4 %, 174.4-174.5 %, 174.5-174.6 %, 174.6-174.7 %, 174.7-174.8 %, 174.8-174.9 %, 174.9-175.0 %, 175.0-175.1 %, 175.1-175.2 %, 175.2-175.3 %, 175.3-175.4 %, 175.4-175.5 %, 175.5-175.6 %, 175.6-175.7 %, 175.7-175.8 %, 175.8-175.9 %, 175.9-176.0 %, 176.0-176.1 %, 176.1-176.2 %, 176.2-176.3 %, 176.3-176.4 %, 176.4-176.5 %, 176.5-176.6 %, 176.6-176.7 %, 176.7-176.8 %, 176.8-176.9 %, 176.9-177.0 %, 177.0-177.1 %, 177.1-177.2 %, 177.2-177.3 %, 177.3-177.4 %, 177.4-177.5 %, 177.5-177.6 %, 177.6-177.7 %, 177.7-177.8 %, 177.8-177.9 %, 177.9-178.0 %, 178.0-178.1 %, 178.1-178.2 %, 178.2-178.3 %, 178.3-178.4 %, 178.4-178.5 %, 178.5-178.6 %, 178.6-178.7 %, 178.7-178.8 %, 178.8-178.9 %, 178.9-179.0 %, 179.0-179.1 %, 179.1-179.2 %, 179.

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.

5 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, 5000-10 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 15 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 20 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 descripción 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.

MODALIDADES

Un agente de unión que comprende una región de unión al antígeno que se une al grupo de diferenciación 3ε (CD3ε), en donde la región de unión al antígeno que se une a CD3ε comprende un scFv engrapado (spFv) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de cadena ligera variable (VL) específica para la unión a CD3ε y una secuencia de enlazador entre VH y VL, en donde el Enlazador comprende al menos un residuo de cisteína (Cys) que sirve como punto de anclaje.

10 El agente de unión de la modalidad 1, en donde el spFv comprende un enlace disulfuro entre un residuo de cisteína expuesto a la superficie en al menos uno de las VH y VL, el punto de anclaje del Enlazador.

El agente de unión de la modalidad 1, en donde el spFv comprende dos enlaces disulfuro, en donde los primeros enlaces disulfuro se forman entre un residuo de cisteína expuesto a la superficie en la VH y un primer punto de anclaje del Enlazador y los segundos enlaces disulfuro se forman entre un residuo de cisteína expuesto a la superficie en la VL un segundo punto de anclaje del Enlazador.

El agente de unión de la modalidad 1, en donde el spFv está en la orientación del VH-Enlazador-VL.

20 El agente de unión de la modalidad 1, en donde el spFv está en la orientación del VL-Enlazador-VH.

El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1-5, en donde el Enlazador se selecciona del grupo que consiste en sec. con núm. de ident.:2, la sec.

con núm. de ident.: 3, la sec. con núm. de ident.: 4, la sec. con núm. de ident.:5 y la sec. con núm. de ident.:6.

El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1-6, en donde la primera región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende secuencias CDR

5 seleccionadas del grupo que consiste en:

a) 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.:9, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con
10 núm. de ident.:10, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12;

b) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:13, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con
15 núm. de ident.:14, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:11, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12;

20 c) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:15, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:16, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:9, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:10, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.:11, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12;

d) 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 la sec. con núm. de ident.:21 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:22;

e) la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:23, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24, la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:25, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:26, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de DSS, y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:12.

El agente de unión de la modalidad 7, en donde en la región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende un dominio de VH como se establece en la sec. con núm. de ident.:28, y un dominio de VL como se establece en la sec. con núm. de ident.:29.

El agente de unión de la modalidad 7, en donde en la región de unión al antígeno que se une a CD3 ϵ comprende un spFv como se establece en la sec. con núm. de ident.:30.

El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 9, en donde el agente de unión es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.

El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 10, que comprende además una región constante de inmunoglobulina (Ig) o un fragmento de la región constante de Ig, en donde opcionalmente el fragmento de la región constante de Ig es una región Fc o un dominio CH3.

- 5 El agente de unión de la modalidad 11, 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.

- El agente de unión de la modalidad 12, en donde la al menos una mutación se selecciona del grupo que consiste en L234A/L235A/D265S, F234A/L235A,
 10 L234A/L235A, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-eliminada/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-
 15 eliminada/G237A/P238S, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

- El agente de unión de la modalidad 12, 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, ,
 20 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.

El agente de unión de la modalidad 12, 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.

5 El agente de unión de una cualquiera de las modalidades 10 a 15, 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 CD3ε.

El agente de unión de la modalidad 16, en donde el segundo antígeno es un antígeno tumoral.

10 Una composición que comprende el agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 17 y un portador farmacéuticamente aceptable.

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 17.

Un vector que comprende el polinucleótido de la modalidad 19.

15 Una célula que comprende el polinucleótido de la modalidad 19.

Un kit que comprende el agente de unión de una cualquiera de las modalidades 1 a 17.

20 Un método para tratar o ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto al menos una molécula de unión de una cualquiera de las modalidades 1-17.

Un método para dirigir una célula T a una célula diana que expresa un antígeno diana, que comprende poner en contacto la célula T con una cantidad efectiva del agente de unión de la reivindicación 16 a 17 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 CD3 ϵ se une a la célula T y la región de unión al antígeno que se une a un segundo antígeno distinto de CD3 ϵ se une a la célula diana.

EJEMPLOS

5

EJEMPLO 1: DISEÑO DE SCFV ESTABILIZADOS

Un anticuerpo monoclonal (mAb) reconoce su antígeno objetivo a través de los dos dominios variables VL y VH. Un Fv monocatenario (scFv) se diseñó por primera vez por Bird et al. (1988) Science 242:423-426 (1988) como una fusión genética de VL y VH con un enlazador flexible en la orientación VL-enlazador-VH o VH-enlazador-VL. El enlazador flexible es típicamente tres o cuatro repeticiones del enlazador glicina-serina. Un scFv recapitula la especificidad de unión al antígeno y en gran medida la afinidad de su mAb parental. Estas moléculas de scFv han encontrado aplicaciones amplias como reactivos de detección/diagnóstico o como bloques aditivos para preparar moléculas más elaboradas tales como terapéuticas bi-, multiespecíficas (Brinkmann y Kontermann (2017) MAbs 9: 182-212) o en terapéuticas de CAR-T (Gross et al., (1989), Transplant Proc 21(1 Pt 1): 127-130; Porter et al., (2011) J Cancer 2: 331-332; Porter et al., (2011) N Engl J Med 365: 725-733).

Uno de los desafíos de las moléculas de scFv es la poca estabilidad y las tendencias a añadirse (revisado en Worn y Pluckthun (2001) J Mol Biol 305: 989-1010; Rothlisberger et al., (2005) J Mol Biol 347: 773-789). Se han intentado diversas estrategias para mejorar sus propiedades (Arnd et al., (2001) J Mol Biol 312: 221-228; Monsellier et al., (2006) J Mol Biol 362: 580-593; Zhao et al., (2010) Int J Mol Sci 12: 1-11; Perchiacca y Tessier (2012) Annu Rev Chem Biomol Eng 3: 263-286; Asial et al.,

(2013) Nat Commun 4: 2901; Gil y Schrum (2013) Adv Biosci Biotechnol 4: 73-84;

Tiller y Tessier (2015) Annu rev Biomed Eng 17: 191-216) Estas estrategias incluyen

introducir enlaces disulfuro entre dominios VL/VH, mejorar la estabilidad del dominio

VL/VH y/o interacciones de interfase usando diferentes métodos experimentales, con

5 motivos de dimerización adicionales y otros. Una dificultad clave es que la mayoría de estas estrategias son frecuentemente específicas para el par VH/VL y no pueden transferirse fácilmente a otros pares VH/VL. Algunas veces, la modificación puede tener un impacto negativo sobre la estructura de VL/VH y la propiedad del scFv.

Recientemente, Zhang et al. introdujo un disulfuro entre la posición 44 de la VH y la

10 posición 100 de la VL de un scFv anti-aflatoxina B1 (H4) y exitosamente logró una estabilización significativa del scFv mientras preserva su afinidad de unión (Zhao et al.,

(2010) Int J Mol Sci 12: 1-11). Sin embargo, debido a las restricciones de distancia y

ángulo entre las dos posiciones elegidas, el disulfuro inter-VL/VH, si se aplica a otros pares VL/VH, puede restringir/distorsionar la orientación relativa entre los dos dominios,

15 que frecuentemente se requiere para la unión.

La interfaz entre las cadenas pesada y ligera del fragmento Fab comprende interacciones VH/VL y CH1/CL. Los dos conjuntos independientes de interacciones proporcionan efectos de estabilización sinérgica. Además, la unión V/C también aporta algunos efectos de estabilización. En comparación, en un scFv la interfaz de VH/VL se

20 mantiene solo por las interacciones VH/VL. El enlazador, diseñado para ser flexible y no restrictivo excepto en los casos en que la longitud está diseñada para ser tan corta como para promover interacciones inter scFv para la formación de dímeros y oligómeros, solo acopla holgadamente a los dos juntos. Se sabe que la longitud y

naturaleza del enlazador, cuando es lo suficientemente largo, aporta poco a la estabilidad del scFv.

1.1 Diseño de “engrapado”

El propósito del trabajo fue diseñar y generar scFv estabilizados al restringir, pero sin afectar negativamente, los movimientos relativos entre la VH y la VL que forman el scFv. Esto se logró al estabilizar el scFv mediante la modificación de enlaces disulfuro entre la VH y la VL y entre la VL y el enlazador. Las restricciones (es decir, enlaces disulfuro), cuando se ubican adecuadamente, después actuarían como los efectos sinérgicos proporcionados por las interacciones CH1/CL y V/C descritas anteriormente. Con este fin se identificaron dos posiciones de marco (puntos de anclaje) expuestas en la superficie conservadas estructuralmente, cada una en VH y VL, que no se superpusieron con el parátipo previsto típico, y se mutaron a residuos de cisteína (Cys). Posteriormente se eligieron dos posiciones en el enlazador flexible para las posiciones de Cys. Cuando se diseñaron las distancias y ubicaciones entre los residuos Cys enlazadores de una manera que facilitaba la formación de enlaces disulfuro entre el Cys enlazador y cada punto de anclaje, la VH y la VL se unirían más ajustadamente entre sí en comparación con la unión en ausencia de los enlaces disulfuro. Este esquema se ilustra en la Figura 1 con un enlazador ilustrativo que contiene la secuencia CPPC (sec. con núm. de ident.: 31). El concepto de formar enlaces disulfuro entre el enlazador flexible y puntos de anclaje se menciona en la presente descripción como “engrapado”. Las moléculas de scFv “engrapadas” resultantes se mencionan en la presente descripción como spFv (“Fv engrapado”).

1.2 Elección de los puntos de anclaje, diseño de secuencias de grapa y enlazadores

Para que el esquema de engrapado pueda aplicarse extensamente es importante que los puntos de anclaje estén estructuralmente conservados, expuestos en la superficie de la VL y de la VH y cuya mutación al residuo Cys no afecte el plegado de VL y VH o la unión a antígenos. Las distancias y la geometría de los puntos de anclaje y los terminales N y C de los dominios VL y VH son también consideraciones importantes para la formación apropiada de disulfuro.

Los puntos de anclaje se eligieron por separado para spFv en la orientación VL-enlazador-VH y VH-enlazador-VL. Para la orientación VL-enlazador-VH, la posición de Chothia 42 en la VL y la posición de Chothia 105 en la VH se eligieron como puntos de anclaje. Una ilustración gráfica de los puntos de anclaje elegidos para el spFv en la orientación VL-enlazador-VH se muestra en la Figura 2 dentro del Fv de un anticuerpo de línea germinal humana (pdb ID 5I19, GLk1 de aquí en adelante). En GLk1, la posición de Chothia en la VL 42 es lisina (K) y la posición de Chothia en VH 105 glutamina (Q). Para la orientación VH-enlazador-VL, la posición de Chothia 100 en la VL y la posición de Chothia 43 en la VH se eligieron como puntos de anclaje. La Figura 3 muestra una ilustración gráfica de los puntos de anclaje elegidos para el spFv en la orientación VH-enlazador-VL dentro del Fv de un anticuerpo de línea germinal humana (pdb ID 5I19, GLk1). En GLk1, la posición de Chothia en la VL 100 es glutamina (Q) y la posición de Chothia en la VH 43 es lisina (K). Los puntos de anclaje elegidos eran estructuralmente conservados, y la geometría era muy similar en anticuerpos que contenían cadenas ligeras kappa o lambda. Las distancias entre los pares de los puntos de anclaje variaron de aproximadamente 7 Å (para la orientación VL-enlazador-VH) a aproximadamente 9 Å (para la orientación VH-enlazador-VL).

Las secuencias de grapa incrustadas dentro del enlazador que conecta la VH y la VL se diseñaron para ser de longitud similar a las distancias entre los puntos de anclaje en el spFv. Como un ejemplo inicial de la secuencia de grapa, se eligió a CPPC (sec. con núm. de ident.: 31) como una posible secuencia de grapa, en parte porque esta secuencia se produce nativamente en la bisagra de IgG1 humana y también en algunas IgG de roedores. Las estructuras de las bisagras de moléculas de IgG humana y de ratón demostraron que las distancias C β (cys1)-C β (cys2) en una bisagra de IgG de ratón (Figura 4) y una IgG humana (Figura 5) variaron de aproximadamente 7 Å a 9 Å. Como este rango era muy similar a las distancias entre los dos puntos de anclaje en ambas orientaciones VL-enlazador-VH y VH-enlazador-VL, la secuencia de grapas CPPC (sec. con núm. de ident.: 31) tenía el potencial de proporcionar una geometría correcta para el engrapado, es decir, formar enlaces disulfuro adecuados eficiente y correctamente a los puntos de anclaje. Generalmente, las secuencias de grapa se diseñaron para tener dos residuos Cys. Para el engrapado adecuado, el Cys N-terminal de la secuencia de grapa formó un enlace disulfuro con el punto de anclaje del dominio N-terminal del spFv y el Cys C-terminal de la secuencia de grapa formó un enlace disulfuro con el punto de anclaje del dominio C-terminal del spFv.

El enlazador que conecta la VH y la VL entonces se diseñó para comprender la secuencia de grapa y conectar secuencias tanto N-terminal como C-terminal a la secuencia de grapa para extender el enlazador para proporcionar suficiente longitud del enlazador para permitir el plegado entre cadenas de la VH y la VL y para facilitar el posicionamiento apropiado de la secuencia de grapa.

En el diseño VL-enlazador-VH, las distancias entre el punto de anclaje de VL (K42), el punto de anclaje de VH (Q105), el C-terminal de la VL (K107) y el N-terminal

de la VH (Q1) se muestran en la Figura 2. En el diseño VH-enlazador-VL, las distancias entre el punto de anclaje de VL (Q100), el punto de anclaje de VH (K43), el C-terminal de la VH (S114) y el N-terminal de la VL (D1) se muestran en la Figura 3. El modelado sugirió que estas distancias pueden estar abarcadas por longitudes del enlazador de aproximadamente 14-19 residuos, en las cuales la secuencia de grapa de 4 residuos está flanqueada por una extensión del enlazador N-terminal de aproximadamente 6-9 residuos y una extensión del C-terminal de aproximadamente 4-6 residuos. Por lo tanto, la longitud del enlazador diseñado por ingeniería podría expresarse como $n+4+m$, en la cual $n=6-9$ residuos y $m=4-6$ residuos y 4 indica la longitud de la secuencia de grapa CPPC (sec. con núm. de ident.: 31). Los residuos n y m podrían ser glicina o serina u otros residuos de aminoácidos. Se espera que estas longitudes de enlazador sean suficientemente largas y flexibles para permitir el engrapado, pero demasiado cortas para permitir el reordenamiento.

EJEMPLO 2: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SPFV

Para evaluar los diseños de engrapado se eligieron tres anticuerpos humanos para generar scFv y los spFv correspondientes: dos anticuerpos con cadenas ligeras kappa (GLk1 y GLk2) de las genotecas de anticuerpos de fagos sintéticos (Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-396) y un anticuerpo que contiene lambda (CAT2200) obtenido de una publicación (Gerhardt et al. (2009) J Mol Biol 394:905-921). Para CAT2200 se introdujo una mutación T28G en la VH parental para generar una variante (CAT2200a) para reducir algunas de sus interacciones con su objetivo, IL-17. Además, una mutación S42Q (Chothia) se modificó en la VL del CAT2200 parental y se apareó con la VH del T28G para generar CAT2200b. Las secuencias de aminoácidos de los

dominios de VL y VH de GLk1, GLk2, CAT2200a y CAT2200b se muestran en la Figura 6 y Figura 7, respectivamente. La secuencia de aminoácidos del dominio de VH es idéntica entre BAT2200a y CAT2200b. GLk1VH está más cerca de IGHV2-23*01 humana, GLk2VH de IGHV5-51 humana, CAT2200VH de IGHV2-23*01 humana.

5 GLk1VL está más cerca de IGKV1-39*01 humana, GLk2VL de IGKV3-20*01 humana y CAT2200VL de IGLV6-57*01 humana.

Todas las moléculas de scFv y spFv se generaron y expresaron en la orientación VL-enlazador-VH y VH-enlazador-VL. Para los constructos de scFv se usó un enlazador estándar (sec. con núm. de ident.: 39). Para el spFv se usaron longitudes de enlazador diferentes entre los rangos de n y m anteriores. Para el spFv de GLk1 se usó los enlazadores 9-4-5 para ambas orientaciones. Para el spFv de GLk2 se usó las longitudes de enlazador 9-4-5 y 6-4-6 para las orientaciones VL-VH y VH-VL, respectivamente. Para el spFv de CAT2200a se prepararon moléculas de VL-VH con los enlazadores 8-4-4 y 9-4-4, respectivamente, y la VH-VL del spFv de CAT2200b se preparó con el enlazador 9-4-4. La Tabla 4 muestra las moléculas generadas y sus secuencias enlazadoras. La Tabla 5 muestra las secuencias de aminoácidos o las moléculas generadas.

Tabla 4.

Nombre de la molécula	Tipo de enlazador	Secuencia de aminoácidos del enlazador	Enlazador sec. con núm. de ident.:
VL-VH de scFv de GLk1	4x G4S	GGGSGGGSGGGSGGGGS	39
GLk1 spFv VL-VH	9+4+5	GGSGSGSGCPCGSGSG	2
VH-VL de scFv de GLk1	4x G4S	AGGGSGGGSGGGSGGGGS	156
GLk1 spFv VH-VL	9+4+5	GGSGSGSGCPCGSGSG	2

Nombre de la molécula	Tipo de enlazador	Secuencia de aminoácidos del enlazador	Enlazador sec. con núm. de ident.:
VL-VH de scFv de GLk2	4x G4S	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	39
GLk2 spFv VL-VH	9+4+5	GGSGSGSGCPCGSGG	2
VH-VL de scFv de GLk2	4x G4S	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	39
GLk2 spFv VH-VL	6+4+6	GGSGGCPGCGGSGG	3
VL-VH de scFv de CAT2200a	4x G4S	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	39
CAT2200a spFv VL-VH	8+4+4	GGSGSGGCPGSGG	4
VL-VH de scFv de CAT2200b	4x G4S	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	39
CAT2200a spFv VL-VH	9+4+4	GGSGSGSGCPCGSGG	5
VH-VL de scFv de CAT2200a	4x G4S	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	39
CAT2200b spFv VH-VL	9+4+4v2	GGSGGGSGCPCGGG	6

Tabla 5.

Nombre de la molécula	Secuencia de proteína	Sec. con núm. de ident.:
VL-VH de scFv de GLk1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKYDGIYGELDFWGQGTTLTVSSGHHHHHH	40
GLk1 spFv VL-VH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGCAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGSGGCPGCGSGGEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KYDGIYGELDFWGCGTLTVSSGHHHHHH	41
VH-VL de scFv de GLk1	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGQGTTLTVSSAGGGGSGGGGSG GGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRHHHHHH	42
GLk1 spFv VH-VL	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGC GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGQGTTLTVSSGGGSGGGSGGCPP CGGSGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ	43

Nombre de la molécula	Secuencia de proteína	Sec. con núm. de ident.:
	KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQSYSTPLTFGCGTKVEIKRGHHHHHH	
VL-VH de scFv de GLk2	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ DYGFPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWM GIIDPSDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARGDGSTDLDYWGGQGLTVTVSSGHHHHHH	44
GLk2 spFv VL-VH	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGCAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ DYGFPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGCPPCGSGGSEVQLVQS GAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGIID PSDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RGDGSTDLDYWGGCGLTVTVSSGHHHHHH	45
VH-VL de scFv de GLk2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKG LEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARGDGSTDLDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKGHHHHHH	46
GLk2 spFv VH-VL	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGCG LEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARGDGSTDLDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGCPPCGGGS GGEIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQDYGFPWTFGCGTKVEIKGHHHHHH	47
VL-VH de scFv de CAT2200a	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQRPSS PTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC QTYDPYSVVFGGGKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDLIHGVTNRNWGGQGLTVTVSSGHHHHHH	48
CAT2200a spFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQRPSCS PTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC QTYDPYSVVFGGGKLTVLGGSGGSGGCPPCGSGGSEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLIHGVTNRNWGGCGLTVTVSSGHHHHHH	49
VL-VH de scFv de CAT2200b	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQRPQGS PTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC QTYDPYSVVFGGGKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDLIHGVTNRNWGGQGLTVTVSSGHHHHHH	50
CAT2200a spFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQRPSCS PTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC	51

Nombre de la molécula	Secuencia de proteína	Sec. con núm. de ident.:
	QTYDPYSVVFGGGKTLTVLGGGSGGSGGCPPCGSGGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDLIHGVTRNWCGLTVTVSSGHHHHH	
VH-VL de scFv de CAT2200a	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLIHGVTRNWCGLTVTVSSGGGGSGGGSGGG GGGGGSGNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWY QQRPGSSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKT EDEADYYCQTYDPYSVVFGGGKTLTVLGHHHHHH	52
CAT2200b spFv VH-VL	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWVRQAPGC GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDLIHGVTRNWCGLTVTVSSGGGGSGGGSGCPPC GGGGNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQR PGQSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDE ADYYCQTYDPYSVVFSGCGLTVLGHHHHHH	53

Todas las moléculas de scFv y spFv excepto CAT2200a scFv VL-VH se clonaron en un vector de expresión de mamífero impulsado por el promotor de CMV. Estos constructos se transfectaron en células Expi293 con protocolos del fabricante y

5 las células se cultivaron durante 5 días. Cada proteína se purificó a partir del sobrenadante clarificado en columnas HP His-TRAP de 1 ml (GE Healthcare) a través de un sistema AKTAPRESS (GE Healthcare). La columna se preparó con un gradiente de regulador de elución 0-100 % (regulador de lavado: Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM; Regulador de elución: Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl

10 500 mM, imidazol 500 mM) para eliminar el níquel unido libremente y, después, reequilibrar en DPBS. El sobrenadante aclarado primero se ajustó hasta Tris 50 mM, pH 7,5 e imidazol 20 mM y, después, se cargó sobre una columna HP HisTRAP de 1 ml a 4 °C 0,8 ml/min. Después, la columna se lavó con PBS hasta obtener valores iniciales estables. Después, la columna se lavó adicionalmente con 20 CV de regulador de

15 lavado, se eluyó con regulador de elución en un solo circuito de inyección y se desaló

en 1X DPBS sobre una columna de desalado HiPrep 26/10 y las fracciones se recolectaron. Después, las fracciones que contenían la proteína purificada se agruparon y concentraron. Las proteínas Glk2 scFv y spFv se dializaron en DPBS para las mediciones de la estabilidad térmica (DSC y NanoDSF) y Tris 25 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM para otros estudios. Las otras proteínas de scFv y spFv se dializaron en MES 25 mM, pH 6,0 y NaCl 100 mM.

Se adquirió CAT2200a scFv VL-VH de un proveedor. La concentración fue de 0,77 mg/ml en DPBS, pH 7,2. Se adquirió un mutante de IL-17 (12-132 con mutaciones K70Q A132Q C106S, IL-17 de aquí en adelante para simplificar (sec. con núm. de ident.: 22) de Accelagen (CA). La proteína se plegó nuevamente a partir del cuerpo de inclusión de E. coli siguiendo su protocolo de replegado patentado y se proporcionó a 1,50 mg/ml en NaCl 20 mM, MES 20 mM, pH 6,0.

2.1 Estabilidad térmica de las moléculas de scFv y spFv generadas

La estabilidad térmica de las moléculas de scFv y spFv se investigó mediante calorimetría térmica diferencial (DSC). Las proteínas de scFv y spFv se dializaron durante la noche contra 1x DPBS (Gibco) para GLk1 y CAT2200a/CAT2200b o MES (MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM) para GLk2. Después, el regulador de diálisis se filtró a través de 0,22 micrones y se usó como la solución de referencia y para blancos regulador-regulador en el experimento de DSC. Las proteínas se diluyeron hasta ~0,5 mg/ml en el regulador filtrado y se cargó 400 µl de cada muestra de proteína o de amortiguador en una placa de 96 pocillos profundos (MicroLiter Analytical Supplies, 07-2100) y se mantuvo a 4 °C en la gaveta del automuestreador durante el transcurso del experimento. Se usó un DSC MicroCal Capillary con automuestreador (Malvern) para

realizar los experimentos de DSC. Los escaneos de DSC se realizaron de 25-95 °C a una velocidad de escaneos de 60 °C/h sin reescaneos de muestras. No se seleccionó la retroalimentación y el periodo de filtrado se fijó en 15 s. Después de cada muestra, las células se limpiaron con una solución Contrad-70 al 10 % y se probó un blanco

5 regulador-regulador. El análisis de datos se realizó con Origin 7.0 con el complemento para análisis automático MicroCal VP-Capillary DSC Automated Analysis (Malvern). El rango y el tipo iniciales se eligieron manualmente y, después, se restaron. El blanco del regulador anterior se restó de la curva de muestra seguido por la normalización dependiente de la concentración. Los perfiles de fusión térmica se analizaron con

10 transiciones de 2 estados y distintas a 2 estados. Los ajustes de dos estados (una transición) concordaron débilmente con las curvas experimentales. Por lo tanto, con dos transiciones (T_{m1} y T_{m2}) se calcularon al realizar manualmente ajustes distintos a 2 estados. Los datos de la T_m se informan en la Tabla 6. Los perfiles de DSC de todas las proteínas de scFv y spFv exhibieron un sesgo que solo podría ajustarse con

15 transiciones distintas a 2 estados. Por lo tanto, para cada scFv o spFv se informaron dos transiciones (T_{m1} y T_{m2}) (Tabla 6). Más probablemente, estas dos transiciones corresponden a la T_m de fusión de los dominios de VL y VH, respectivamente. Generalmente, al comparar, las diferencias entre el scFv y el spFv para T_{m1} o T_{m2} , hay un aumento de apenas 10 °C por engrapado, independientemente de la T_m del

20 scFv inicial. Hay una sola excepción, es decir, el caso de diferencia de scFv y spFv de GLk2 (orientación VH-VL), a ~7 °C. Esto es probable debido al enlazador 6+4+6 más corto que puede haber causado una ligera tensión en la geometría de engrapado. El hecho de que ΔT_{m1} (VL) y ΔT_{m2} (VH) fueron casi idénticos sugiere que el engrapado condujo a la estabilización de los dominios propiamente dichos además del

fortalecimiento de las interacciones VL/VH. Alternativamente, las interacciones VH/VL más fuertes transmiten los efectos de estabilización en la estabilización de los dominios VL/VH. En resumen, el engrapado como se describe en este trabajo aumenta significativamente la estabilidad del scFv.

5

Tabla 6.

Nombre de la molécula	Tipo de enlazador	Estabilidad por DSC						
		Tm1 (°C)	DE(Tm1) (°C)	Tm2 (°C)	DE(Tm2) (°C)	$\Delta Tm1$ (°C)	$\Delta Tm2$ (°C)	$\Delta(Tm1-Tm2)$
VL-VH de scFv de GLk1	4x G4S	68,9	0,2	72,1	0,0	9,7	9,0	3,3
GLk1 spFv VL-VH	9+4+5	78,5	0,2	81,1	0,0			2,6
VH-VL de scFv de GLk1	4x G4S	67,7	0,3	70,9	0,0	10,0	9,2	3,3
GLk1 spFv VH-VL	9+4+5	77,7	0,2	80,1	0,1			2,4
VL-VH de scFv de GLk2	4x G4S	56,6	0,2	58,6	0,1	10,9	10,5	2,0
GLk2 spFv VL-VH	9+4+5	67,6	0,3	69,2	0,1			1,6
VH-VL de scFv de GLk2	4x G4S	56,4	0,1	58,3	0,1	7,3	7,1	1,9
GLk2 spFv VH-VL	6+4+6	63,7	0,3	65,4	0,1			1,7
VL-VH de scFv de CAT2200a	4x G4S							
CAT2200a spFv VL-VH	8+4+4							
VL-VH de scFv de CAT2200b	4x G4S	54,7	0,3	57,6	0,0	12,0	11,7	2,9
CAT2200a spFv VL-VH	9+4+4	66,7	0,3	69,3	0,0			2,6
VH-VL de scFv de CAT2200a	4x G4S	52,6	0,3	56,4	0,0	12,9	11,4	3,8
CAT2200b spFv VH-VL	9+4+4	65,5	0,3	67,9	0,0			2,4
$\Delta Tm1$ (°C): Diferencia en Tm1 (spFv) y Tm1 (scFv)								
$\Delta Tm2$ (°C): Diferencia en Tm2 (spFv) y Tm2 (scFv)								
$\Delta(Tm1-Tm2)$: Diferencia de Tm2 y Tm1 de un scFv o spFv								

EJEMPLO 3: VERIFICACIÓN DEL ENGRAPADO CORRECTO POR CRISTALIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE SCFV Y SPFV GENERADAS

Las proteínas se concentraron en sus respectivos reguladores: GLk1 spFv VL-VH a 8,67 mg/ml en 25 mM de MES, pH 6,0, 100 mM de NaCl; GLk1 spFv VH-VL a 5 mg/ml en MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM; GLk2 spFv VH-VL a 8,66 mg/ml en Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM; cat2200b spFv VH-VL a MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM. Se estableció la cristalización para cada proteína en formato de gota sentada en bandejas de cristal Corning 3550 con el uso de un robot Mosquito. Cada pocillo contiene 100 nl de proteína y 100 nl de solución de reserva y se incubó contra 70 µl de reserva a 20 °C. Las soluciones de reserva son IH1 y IH2 en condiciones habituales así como PEG Ion Screen HT (Hampton Research). Algunas de las condiciones iniciales se refinaron variando los componentes de reserva en intentos de optimización. Se obtuvieron cristales de calidad de difracción para algunas proteínas de scFv y spFv. La Tabla 7 muestra el resumen de las condiciones usadas. Los cristales se remojaron durante unos pocos segundos en el licor madre complementado con glicerol al 20 % y se congelaron instantáneamente en N2 líquido. Los datos de rayos X se recolectaron en IMCA-CAT Beamline 17ID en Argonne National Lab.

Tabla 7.

Nombre de la molécula	Proteína	Condición de cristalización	¿Disulfuros?	Resolución (Å)
GLk1 spFv VL-VH	8,67 mg/ml, MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM	Acet de Na 0,1 M 4,5 de pH, 18 % p/v de PEG 3350, LiCl 1 M	Sí	1,65
GLk1 spFv VH-VL	5 mg/ml, MES 25 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM	MES 0,1 M 6,5 de pH, 5 % v/v de PEG 400, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,75 M	Sí	2,10
GLk2 spFv VH-VL	8,66 mg/ml, Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM	0,1 M de acet. de Na pH 4,5, 0,75 M de (NH ₄) ₂ SO ₄	Sí	1,50
CAT2200b spFv VH-VL	4,91 mg/ml, MES 25 mM, pH 6,0 NaCl 100 mM	Acet de Na 0,1 M pH 4,5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,5 M	Sí	2,40

Nombre de la molécula	Proteína	Condición de cristalización	¿Disulfuros?	Resolución (Å)
Complejo CAT2200a scFv VL-VH/IL-17	2,69 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM	Tris 0,1 M, pH 8,5, 18 % de PEG3K, LiSO4 0,2 M	no engrapado	2,30
Complejo CAT2200a spFv VL-VH/IL-17	6,0 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM	15,5 % de PEG 3350, 0,4 M de NaH ₂ PO ₄	Sí	2,00

3.1 Cristalización de CAT2200a scFv VL-VH y CAT2200a spFv VL-VH en complejo con IL-17

El complejo IL-17/ CAT2200a scFv VL-VH se generó al mezclar 333 µl de IL17

- 5 (1,5 mg/ml) con 1,74 ml de Cat2200a scFv (0,69 mg/ml) e incubar durante 3 horas a 4 °C. La mezcla se concentró con 10 kDa de concentrador Amicon Ultra de corte a aproximadamente 400 µL y se cargó sobre una columna Superdex75 equilibrada en NaCl 250 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5. Las fracciones correspondientes al complejo se agruparon y concentraron hasta un volumen de 150 µL. La muestra se diluyó y
- 10 concentró 4 veces: adición de 350 µL de NaCl 50 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5 y concentración hasta justo por debajo de 150 µL. El volumen se llevó hasta ~105 µL y se determinó que la concentración era de 2,69 mg/ml. La cristalización se configuró en un formato de gota sentada mediante el uso de un robot de cristalización Mosquito con 150 nl de proteína + 150 nl de reserva en placas Corning3550 contra 80 µL de reserva,
- 15 que es un conjunto de amortiguador y condiciones precipitantes preformuladas internamente. Las placas se incubaron a 20 °C. Una de las condiciones (acetato de Na, pH 4,5, PEG 3K al 25 %, acetato de Am 0,2 M) produjo cristales muy pequeños. Estos se cosecharon y transformaron en semillas de cristalización con el uso de Hampton

Seed Bead en 100 μ L de PEG 3350 al 27 %, acetato de amonio 200 mM, acetato de sodio 100 mM, pH 4,5 en un tubo Hampton Seed Bead.

Los cristales de calidad de difracción se obtuvieron por el mismo procedimiento con la excepción de la adición de las semillas anteriores: 150 nl de proteína + 100 nl de reserva + 50 μ l de semillas. Los cristales crecieron de Tris 0,1 M 8,5, PEG3K al 18 %, LiSO₄ 0,2 M y se transfirieron a un licor madre sintético (Tris 0,1 M, pH 8,5, PEG 3350 al 10 %, LiSO₄ 0,2 M y glicerol al 20 %) y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron en IMCA-CAT ID17 en Argonne National Laboratory.

El complejo IL-17/ CAT2200a spFv VL-VH se generó al mezclar 167 μ l de IL-17 (250 μ g) con 154 μ l MSCW274 (467 μ g en NaCl 250 mM, MES 20 mM, pH 6,5) y la incubación a 4 °C durante la noche. La mezcla se concentró en 0,5 ml de concentrador de 10kDa MWCO Amicon Ultra hasta ~100 μ L, después se diluyó repetidamente y se concentró 5 veces: se concentró hasta ~150 μ L y se añadió 350 μ L de NaCl 50 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5. El volumen final fue de 100 μ L y la concentración del complejo se determinó en 6,0 mg/ml. La cristalización se configuró de manera similar a la del complejo scFv/IL-17 en gotas sentadas mediante el uso del robot Mosquito. La gota sentada está compuesta por 150 nl de proteína + 120 nl de reserva + 30 nl de semillas (scFv/IL-17 anterior). La solución de reserva era un conjunto de condiciones que variaba la concentración de PEG 3350 y las sales. Las placas de cristalización se incubaron a 20 °C. Se obtuvo cristales pequeños de PEG 3350 al 15,5 %, 0,4 M de NaH₂PO₄. Los cristales se transfirieron a PEG 3350 al 16 %, 0,2 M de NaH₂PO₄, glicerol al 20 % y LN2 congelado instantáneamente. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron en IMCA-CAT ID17 en Argonne National Laboratory.

Todos los datos de difracción de rayos X se procesaron con XDS (Kabsch et al. (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt. 2):125-132; Monsellier y Bedouelle (2006) *J Mol Biol* 362:580-593) y CCP4 (Collaborative Computational Project, N. (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255). Todas las estructuras cristalinas se resolvieron mediante reemplazo molecular (RM) con el uso de Phaser (Read (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 10):1373-1382) con modelos de homología generados en MOE (Montreal, Canadá) excepto para el complejo scFv CAT2200a scFv VL-VH/IL-17, para el cual se usó la estructura de pdb id 2vxs (Gerhardt et al. (2009) *J Mol Biol* 394:905-921) como modelo de búsqueda. Se refinaron los modelos estructurales en PHENIX (Adams et al. (2004) *J Synchrotron Radiat* 11, 1-55 (53)) y se ajustaron manualmente en COOT (Emsley et al. (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4):486-501). Las figuras de los gráficos moleculares se generaron en PyMol ([www_schrodinger_com](http://www.schrodinger.com)).

3.1.1 Las estructuras

Las estructuras de las moléculas de scFv y spFv no unidas se muestran en la Figura 8, Figura 9, Figura 10 y Figura 11. La Figura 8 muestra la estructura de GLk1 spFv VL-VH. La Figura 9 muestra la estructura de GLk1 spFv VH-VL. La Figura 10 muestra la estructura de GLk2 spFv VH-VL. La Figura 11 muestra la estructura de CAT2200b spFv VH-VL. Las estructuras fueron consistentes con las estructuras típicas de Fv con ambos dominios de VL y VH empaquetados uno contra el otro.

Generalmente, la mayoría de los residuos enlazadores se ordenaron y resolvieron en los mapas de densidad de electrones. Los enlaces disulfuro entre la grapa y los puntos de anclaje se ordenaron generalmente bien en ambas orientaciones de VL-VH.

Además de las estructuras de scFv y spFv no unidas, también intentamos revelar

cualquier impacto estructural sobre la unión al antígeno. Las moléculas variantes de CAT2200 scFv y spFv se cristalizaron en complejo con su objetivo cognado, IL-17.

Para los scFv y spFv de las variantes de CAT2200 cristalizadas, las estructuras fueron casi idénticas con y sin un objetivo unido (Figura 12, Figura 13, Figura 14). La Figura 12

muestra la comparación entre el CAT2200b spFv VH-VL no unido y el CAT2200a scFv VL-VH unido a IL-17. La Figura 13 muestra la comparación entre las vistas delanteras

de las estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido y el CAT2200a spFv VL-VH

unido a IL-17. La Figura 14 muestra la comparación entre las vistas posteriores de las

estructuras del CAT2200b spFv VH-VL no unido y el CAT2200a spFv VL-VH unido a IL-

17. Las estructuras fueron también idénticas independientemente de la orientación o la

presencia o ausencia de la grapa. La rmsd para todos los átomos de C α coincidentes

entre pares de estructuras fue muy pequeña: 0,41 Å entre spFv-VH-VL no unido y

scFv-VL-VH unido al antígeno (Figura 12), 0,46 Å entre spFv-VH-VL no unido y spFv-

VL-VH (Figura 13 y Figura 14, respectivamente) y 0,37 Å entre scFv unido y spFv

unido. La evidencia estructural muestra que el engrapado funciona tal como se diseñó.

También, el engrapado no tiene impacto en las estructuras de dominio de VL y VH o

empaquetamiento de VL/VH relativo.

EJEMPLO 4: DISEÑO DE PUNTOS DE ANCLAJE ADICIONALES

El método descrito en el Ejemplo 1 se usó para identificar cualquier punto de anclaje adicional para engrapado. Se identificaron los siguientes puntos de anclaje:

Para la orientación VL-enlazador-VH: posición de Chothia en VL 42, 45 y 39 y posiciones de Chothia en VH 105, 5 y 3. En la Figura 6, los residuos de la VL en

GLk1VL son K42, K45, K39 y los residuos de la VH en GLk1 son Q105, L5 y Q3. La grapa se forma entre cualquiera de las posiciones indicadas.

Para la orientación VH-enlazador-VL: posiciones de Chothia en VH 43, 40 y 46, posiciones de Chothia en VL 102, 5 y 3, la grapa se forma entre cualquiera de las

5 posiciones.

EJEMPLO 5: GENERACIÓN DE ANTICUERPO PSMA×CD3 GRAPADO (PS3B2040)

PS3B1396 es un anticuerpo IgG1 completamente humano dirigido contra los

10 receptores CD3 y PSMA. La generación de PS3B1396 se describe en la solicitud de los EE. UU. núm. 63/142.921 presentada el 28 de enero de 2021 y la solicitud de los EE. UU. núm. 63/165.448 presentada el 24 de marzo de 2021, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. PS3B1396 comprende el brazo de unión a CD3 de CD3B2030 N106A LH scFv y el brazo de unión

15 a PSMA de PSMB896-G100A-Fab.

Los ensayos para evaluar las actividades funcionales de PS3B1396 y las propiedades estructurales tales como, p. ej., secuencias de aminoácidos también se describen en detalle en la solicitud de los EE. UU. núm. 63/142.921 presentada el 28 de enero de 2021 y la solicitud de los EE. UU. núm. 63/165.448 presentada el 24 de

20 marzo de 2021, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

El scFv del brazo de unión CD3 de PS3B1396 se diseñó por ingeniería en un scFv estabilizado, en la presente denominado spFv (o “scFv engrapado”) al restringir la estructura del scFv, sin impactar negativamente, los movimientos relativos entre la VH

y la VL. El scFv estabilizado se generó 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 y se mutaron en residuos de cisteína (Cys) para generar la VH de la sec. con núm. de ident.: 28 y VL de la sec. con núm. de ident.: 29. Se usó un enlazador flexible de secuencia GGGSGGSGGCPPCGGSGG (sec. con núm. de ident.: 2) que comprende dos residuos Cys para conjugar VL y VH en el formato VL-enlazador-VH (LH). 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 anti-CD3 (anti-CD3 spFv) en el formato VL-Enlazador-VH se emparejó entonces con anti-PSMA Fab (PSMB896-G100A-Fab) usando homodimerización Fc botón en ojal para generar el PSMAxCD3 biespecífico engrapado (PS3B2040). La caracterización de generación de PSMB896-G100A-Fab se describe en la Solicitud de los EE. UU. núm. 63/142.921 presentada el 28 de enero de 2021, y en la Solicitud de los EE. UU. núm. 63/165.448 presentada el 24 de marzo de 2021, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Las secuencias de los dominios de unión PSMA y CD3 de PS3B2040 se describen a continuación.

El dominio de unión PSMA de PS3B2040 comprende HCDR1 de la secuencia de aminoácidos SYAMS (sec. con núm. de ident.: 54), la HCDR2 de la secuencia de aminoácidos AISGGIGSTYYADSVKG (sec. con núm. de ident.: 55), y la HCDR3 de la secuencia de aminoácidos DAVGATPYFYFDY (sec. con núm. de ident.: 56) y la LCDR1

de la secuencia de aminoácidos SGSSSNIGINYVS (sec. con núm. de ident.: 57) y la LCDR2 de la secuencia de aminoácidos DNNKRPS (sec. con núm. de ident.: 58), y la LCDR3 de la secuencia de aminoácidos GTWDSSLSAVV (sec. con núm. de ident.: 59) usando la delineación de Kabat.

5 VH, VL, HC, LC DE DOMINIO DE UNIÓN DE PS3B2040 PSMA

Secuencia de aminoácidos VH del dominio de unión PS3B2040 PSMA; Sec. con núm. de ident.: 60

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGIGS
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAVGATPYYFDYWGQG

10 TL VTVSS

Secuencia de aminoácidos VL del dominio de unión PS3B2040 PSMA; Sec. con núm. de ident.: 61

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGINYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGI
 PD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL

15 Secuencia de aminoácidos HC1 del dominio de unión PS3B2040 PSMA; Sec. con núm. de ident.: 62

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGIGS
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAVGATPYYFDYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

20 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVS VSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos LC1 del dominio de unión PS3B2040 PSMA; Sec. con núm. de ident.: 63

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGINYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVLGQPKAA
5 PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN
KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Secuencia de ácido nucleico HC1 del dominio de unión PS3B2040 PSMA; Sec. con núm. de ident.: 64

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGTTCTCTGA
10 GACTGTCTTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGCTATGTCCTGGGTC
CGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCTATCTCTGGCGGCATC
GGCTCTACCTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACA
ACTCCAAGAACACCCTGTGGCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATACCGC
CGTGTACTACTGTGCCAAGGATGCCGTGGGCGCTACCCCTTACTACTTCGATTATT
15 GGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTTTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT
CTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
20 CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCG
CCGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCCTTCCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA

AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
 GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTGGAACA
 AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
 5 GGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGAT
 GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCG
 GTTCACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

10 Secuencia de ácido nucleico LC1 del dominio de unión PS3B2040 PSMA; Sec. con
 núm. de ident.: 65

CAGTCTGTGCTGACCCAGCCTCCTTCTGTGTCTGCTGCTCCTGGCCAGAAAGTGA
 CCATCTCCTGCTCCGGCTCCTCCTCCAACATCGGCATCAACTACGTGTCCTGGTAT
 CAGCAGCTGCCCCGGCACAGCTCCCAAAGTCTGATCTACGACAACAACAAGCGGC
 15 CCAGCGGCATCCCTGACAGATTCTCCGGATCTAAGTCCGGCACCTCTGCTACCCT
 GGGCATCACAGGATTGCAGACAGGCGACGAGGCCGACTACTATTGCGGCACCTG
 GGAATCTTCTCTGTCCGCCGTTGTTTTTGGCGGTGGCACCAAGCTGACAGTGCTG
 GGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGC
 TTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC
 20 CGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTCGAAAC
 CACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGC
 CTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATG
 AAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

VH, VL, VL-LINKER-VH, HC DEL DOMINIO DE UNIÓN A PS3B2040 CD3

Secuencia de aminoácidos de VH del dominio de unión a PS3B2040 CD3. sec. con
núm. de ident.:28

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPSSAY
TNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGC
5 GTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos de VL del dominio de unión a CD3. sec. con núm. de
ident.:29

EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASGV
PARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK

10 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS SPFV (VL-ENLAZADOR VH) DEL DOMINIO DE
UNIÓN A PS3B2040 CD3; Sec. con núm. de ident.: 30

EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASGV
PARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGSG
GCPPCGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQGL
15 EWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASPQVHY
DYAGFPYWGCGTLVTVSS

secuencia de aminoácidos HC2 (spFv-Fc) del dominio de unión a CD3 de PS3B2040;
Sec. con núm. de ident.: 66

EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGCAPRRWIYDSSKLASGV
20 PARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGS
GGCPPCGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVKQAPGQ
GLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASPQ
VHYDYAGFPYWGCGTLVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV

LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de ácido nucleico HC2 (scFv-Fc) del dominio de unión a PS3B2040 CD3; Sec.

5 con núm. de ident.: 67

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGTGCTTCTCCAGGCGAGAGAGT
 GACCCTGTCCTGCTCCGCTTCCTCCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGA
 AGCCCGGCTGCGCCCCTAGAAGATGGATCTACGACTCCTCCAAGCTGGCCTCTGG
 CGTGCCTGCTAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCAGAGACTATACCCTGACAATCT
 10 CCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCTAGGAAC
 CCTCCTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGGCGGAGGTTCTGGTG
 GATCTGGCGGATGTCCTCCTTGTGGTGAAGCGGCGGACAGGTTCACTGGTTCA
 GTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCTCCTCCGTGAAAGTGTCCTGCAAGGCTT
 CCGGCTACACCTTTACCAGATCCACCATGCACTGGGTCAAGCAGGCCCTGGACAA
 15 GGCTTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCAGCTCCGCCTACACCAACTACAACCA
 GAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTACA
 TGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCTCCT
 CAGGTTCACTACGACTACGCCGGCTTTCTTATTGGGGCTGTGGCACCTGGTCAC
 CGTTTCTTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
 20 CACCTGAAGCCGCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG

GTGTCGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
 GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
 5 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
 CAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

5.1 Expresión de PS3B2040

10 PS3B2040 se expresó en células ExpiCHO™ mediante transfección transitoria con ADN plasmídico purificado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células ExpiCHO™ se mantuvieron en suspensión en medio de expresión ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, núm. de cat. A29100) en una incubadora con agitación orbital a 37 °C, 8 % de CO₂ y 125 RPM. Las células se
 15 sometieron a pasaje y se diluyeron antes de la transfección a 6,0 x 10⁶ células por ml, manteniendo la viabilidad celular a 99,0 % o mejor. Las transfecciones transitorias se realizaron usando el kit de transfección ExpiFectamine™ CHO (ThermoFisher Scientific núm. de cat. A29131). Por cada ml de células diluidas a transfectar, se usaron 0,25 microgramos de plásmido que comprendía una copia cada una de las PSMA HC y LC,
 20 y 0,25 microgramos de un plásmido que comprendía una copia cada una de las CD3 HC y PSMA LC y 0,5 microgramos de ADN pAdVantage (Promega, núm. de cat. E1711) y se diluyó en medio de complejación OptiPRO™ SFM. Para cada litro de células, se diluyeron 2,56 ml de reactivo CHO ExpiFectamine™ en 8 ml de OptiPRO™. El ADN diluido y el reactivo de transfección se combinaron durante un

minuto, permitiendo la formación del complejo ADN/lípido, y después se añadieron a las células. Después de la incubación durante la noche, se añadió a las células el alimentador ExpiCHO™ y el potenciador ExpiFectamine™ CHO a las células de acuerdo con el protocolo estándar de fabricante. Las células se cultivaron durante con 5 agitación orbital (125 rpm) a 37 °C durante siete días, antes de recolectar el caldo de cultivo. Los sobrenadantes de cultivo de las células ExpiCHO-S™ transfectadas se clarificaron por centrifugación (30 min, 3000 rcf) seguido de filtración (membrana PES 0,2 µm, Corning; Corning, NY).

5.2 Purificación de PS3B2040

El sobrenadante de cultivo celular filtrado se cargó en una columna de proteína A MabSelect SuRe (GE Healthcare) preequilibrada y personalizada de 120 ml (1xDPBS, pH 7,2) usando un sistema de cromatografía AKTA Avant 150. Después de la carga, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (CV, por sus siglas en inglés) 15 de 1xDPBS, pH7,2. La proteína se eluyó con 8 CV de acetato de sodio (Na) de 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones de proteínas se neutralizaron completamente mediante la adición de 2,5 M de Tris HCl, pH 7,2 a 15 % (v/v) del volumen final y se filtraron con jeringa (0,2 µm). A continuación, la solución de proteína neutralizada se dializó contra MES 20 mM, pH 5,5 antes de cargarlo en una columna preequilibrada (20 mM MES, pH 20 6,5) personalizada Capto S ImpAct (170 ml). La columna se lavó a 19 ml/min durante 1,5 CV con MES 20 mM, pH 6,5. El gradiente de elución de proteínas comenzó a 0-5 % sobre 1 CV a 15 ml/min. Entonces el gradiente se incrementó a 30 % sobre 15 CV (regulador A: 20 mM MES, pH 6,5; regulador B: 20 mM de MES, NaCl 1M, pH 6,5). Se

agruparon las fracciones pico principales, se dializaron en 1×DPBS, pH7,2 y se filtraron (0,2 µm).

5.3 Unión del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en células diana mediante citometría de flujo.

PS3B2040 se evaluó para su unión a la línea celular comercial de cáncer de próstata que expresa PSMA. Las células tumorales de próstata humana LNCap se lavaron con DPBS y se añadió tripsina al 0,25 % para permitir que las células se desprendieran. Se añadió medio para neutralizar la tripsina y las células se transfirieron a un cónico de 15 ml con DPBS. Las células se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos. El DPBS se aspiró y las células se volvieron a suspender en DPBS. Las células se contaron usando el analizador de viabilidad celular Vi-cell XR y se sembraron a 100 K/pocillo en 100 µl de DPBS. La placa se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos y se lavó 2 veces con DPBS. Las células se tiñeron con tinción Violet Live/Dead (Thermo-Fisher) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 min. Las células se centrifugaron y lavaron 2 veces con regulador de tinción FACS (BD Pharmingen).

PS3B2040 se diluyó hasta una concentración inicial final de 100 nM en regulador de tinción FACS y se prepararon diluciones en serie de 3 veces a partir de la concentración inicial para un total de 10 puntos de dilución. PS3B2040 diluido en serie (100 µl/ pocillo) se añadió a las células y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Las células se lavaron 2 veces con regulador de tinción FACS y se añadió anticuerpo secundario antihumano de cabra conjugado con AlexaFluor 647 (Jackson Immunoresearch) y se dejó incubar con las células durante 30 min a 4 °C. Las células

se lavaron 2 veces con regulador de tinción FACS y se volvieron a suspender en 200 μ l de regulador FACS. Las células se procesaron en BD CELESTA usando el software FACS Diva y se analizaron usando el software FLOWJO. La Figura 15 muestra que el anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) muestra la unión celular PSMA dependiente de la dosis con una EC50 de 11,62 nM.

5.4 Unión del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en células PAN-T a través del flujo.

Se descongelaron células humanas PAN-T (Biological Specialty Corporation, Colmar, PA) y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml con DPBS. Las células se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos. El DPBS se aspiró y las células se volvieron a suspender en DPBS. Las células se contaron usando el analizador de viabilidad celular Vi-cell XR y se sembraron a 100 K/pocillo en 100 μ l de DPBS. La placa se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos y se lavó 2 veces con DPBS. Las células se tiñeron con tinción Violet Live/Dead (Thermo-Fisher) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 min. Las células se centrifugaron y lavaron 2 veces con regulador de tinción FACS (BD Pharmingen). PS3B2040 se diluyó hasta una concentración inicial final de 1 μ M en regulador de tinción FACS y se prepararon diluciones en serie de 3 veces a partir de la concentración inicial para un total de 10 puntos de dilución.

PS3B2040 diluido en serie (100 μ l/ pocillo) se añadió a las células y se incubaron durante 60 min a 4 °C.

Las células se lavaron 2 veces con regulador de tinción FACS y se añadió anticuerpo secundario antihumano de cabra conjugado con AlexaFluor 647 (Jackson

Immunoresearch) y se dejó incubar con las células durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron 2 veces con regulador de tinción FACS y se volvieron a suspender en 200 µl de regulador FACS. Las células se procesaron en BD Celesta usando el software FACS Diva y se analizaron usando el software FLOWJO. La Figura 16 muestra que el anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) muestra la unión a células CD3 dependiente de la dosis mediante citometría de flujo.

5.5 Citotoxicidad del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en células diana usando PBMC humanas a través de Incucyte

Las células tumorales de próstata humana LNCaP se lavaron con DPBS y se añadió tripsina al 0,05 % para permitir que las células se desprendieran. Se añadió medio para neutralizar la tripsina y las células se transfirieron a un cónico de 15 ml con DPBS. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. El DPBS se aspiró y las células se volvieron a suspender en DPBS. Las células se contaron usando el analizador de viabilidad celular Vi-cell XR y se sembraron a 15 K/pocillo en 100 µl de DPBS. Las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche. Se descongelaron células humanas PBMC (Discovery Life Services) y se transfirieron a un cónico de 15 ml con DPBS. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. El DPBS se aspiró y las células se volvieron a suspender en DPBS. Las células se contaron usando el analizador de viabilidad celular Vi-cell XR y se sembraron a una E:T de 3:1(normalizado a % de CD3) en 50 µl de RPMI-10/pocillo. PS3B2040 se preparó en un bloque de dilución con una concentración inicial de 30 nM, diluido 3 veces para un total de 10 puntos de dilución incluyendo un control no tratado. Se añadió PS3B2040 a 50 µl/pocillo en RPMI-10 y las placas se colocaron en un sistema de imágenes Incucyte

SX5 (Essen) y se escanearon cada 6 h durante 120 h. Los datos se analizaron al normalizar al tiempo 0 y se determinó el % de lisis tumoral y se graficó (GraphPad Prism) usando un ajuste no lineal, log(agonista) vs. respuesta – pendiente variable (4-parámetros). La Figura 17 muestra la citotoxicidad dependiente de la dosis del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en PBMC humanas con una EC50 de 0,051 nM.

5.6 Citotoxicidad del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en la diana usando células T Pan a través de Incucyte

Las células tumorales de próstata humana LNCaP se lavaron con DPBS y se añadió tripsina al 0,05 % para permitir que las células se desprendieran. Se añadió medio para neutralizar la tripsina y las células se transfirieron a un cónico de 15 ml con DPBS. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. El DPBS se aspiró y las células se volvieron a suspender en DPBS. Las células se contaron usando el analizador de viabilidad celular Vi-cell XR y se sembraron a 15 K/pocillo en 100 µl de RPMI-10 (**sin rojo de fenol). Las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche. Se descongelaron células humanas Pan T (Discovery Life Sciences) y se transfirieron a un cónico de 15 ml con DPBS. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. El DPBS se aspiró y las células se volvieron a suspender en DPBS. Las células se contaron usando el analizador de viabilidad celular Vi-cell XR y se sembraron a una E:T de 3:1 en 50 µl de RPMI-10/pocillo. PS3B2040 se preparó en un bloque de dilución con una concentración inicial de 30 nM, diluido 3 veces para un total de 10 puntos de dilución incluyendo un control no tratado. PS3B2040 se añadió a 50 µl/pocillo en RPMI-10 y las placas se colocaron en una Incucyte SX5 (Essen) y se

escanearon cada 6 h durante 120 h. Se analizaron los datos normalizando al tiempo 0 y se determinó el % de lisis tumoral y se graficó (GraphPad Prism) usando un ajuste no lineal, log(agonista) vs respuesta – pendiente variable (4-parámetro). La Figura 18 muestra la citotoxicidad dependiente de la dosis del anticuerpo PSMAxCD3 engrapado (PS3B2040) en células Pan T humanas con una EC50 de 0,06 nM.

EJEMPLO 6: GENERACIÓN DE ANTICUERPO CD3 X ENPP3 ENGRAPADO (NPP3B815)

NPP3B815 es un anticuerpo biespecífico (BsAB) que consiste en cadena pesada NPP3B56 (HC)2 x CD3B2030 N106A-LH. NPP3B56 es el aglutinante específico para ENPP3. 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.

6.1 NPP3B815

NPP3B815 (NPP3B56xCD3B2030-N106A-spFv) es un IgG1 BsAb que se une simultáneamente a CD3ε (Ident. de Uniprot: P07766) en células T y a ENPP3 (Ident. de

Uniprot: O14638) en células tumorales (Figura 19). El anticuerpo presenta mutaciones de L234A, L235A y D265S (AAS; numeración EU) en la región Fc para abolir la interacción con los receptores Fc y la heterodimerización se potencia usando las mutaciones de botones en ojales. La molécula comprende un spFv anti-CD3 en HC1.

- 5 El scFv generado por una fusión genética de la cadena ligera de región variable (VL) y la cadena pesada de región variable (VH) con un enlazador flexible en cualquiera de las orientaciones recapitula la especificidad de unión al antígeno y en gran medida la afinidad de un Fv parental. El scFv se ha utilizado como bloque de construcción para una variedad de productos biológicos terapéuticos multiespecíficos.
- 10 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
- 15 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
- 20 agregación de terapias observadas en scFv.

El spFv consiste en un enlazador que tiene un motivo central ‘C1PPC2’ (sec. con núm. de ident.: 157) en donde C1 forma un enlace disulfuro con (en el caso del spFv en la orientación ‘ligera-pesada’) una cisteína diseñada por ingeniería en la posición 43 (numeración de Chothia) en el dominio de VL y C2 forma un enlace

disulfuro con una cisteína diseñada en la posición 100 en el dominio de 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-CD3 ϵ spFv ‘botón’ con la Fab HC anti-ENPP3 que contiene el ‘ojal’ y emparejada con la cadena ligera (LC). La región variable anti-CD3 ϵ 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 CD3 ϵ . 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 CD3 ϵ 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.

Las secuencias del dominio de unión a ENPP3 se muestran en la Tabla 8. Las secuencias de aminoácidos del brazo de unión a CD3 se muestran en sec. con núm. de ident.: 28 (VH), sec. con núm. de ident.: 29 (VL), sec. con núm. de ident.: 30 (spFv (VL-enlazador VH)), y la sec. con núm. de ident.: 96 (spFv-Fc de cadena pesada). Las secuencias de nucleótidos que codifican el brazo de unión a CD3 se muestran en sec. con núm. de ident.: 68 (VH), sec. con núm. de ident.: 69 (VL), sec. con núm. de ident.: 70 (spFv (VL-enlazador VH)), y la sec. con núm. de ident.: 99 (spFv-FC de cadena pesada). Las secuencias de ácido nucleico se muestran en la Tabla 10.

Tabla 8: 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.: 71)	GFTFSDY (sec. con núm. de ident.: 77)	GFTFSDYSMN (sec. con núm. de ident.: 79)	SDYSMN (sec. con núm. de ident.: 81)	GFTFSDYS (sec. con núm. de ident.: 87)
Región variable de cadena pesada CDR2	SISSISSYVKY ADSVKG (sec. con núm. de ident.: 72)	SSISSY (sec. con núm. de ident.: 78)	SISSISSYVK (sec. con núm. de ident.: 80)	WVSSISSISSYVK (sec. con núm. de ident.: 82)	ISSISSYV (sec. con núm. de ident.: 88)
Región variable de cadena pesada CDR3	GHYFDY (sec. con núm. de ident.: 73)	GHYFDY (sec. con núm. de ident.: 73)	GHYFDY (sec. con núm. de ident.: 73)	ARGHYFD (sec. con núm. de ident.: 83)	ARGHYFDY (sec. con núm. de ident.: 89)
Región variable de cadena ligera CDR1	RASQSVSSNL A (sec. con núm. de ident.: 74)	RASQSVSSNLA (sec. con núm. de ident.: 74)	RASQSVSSNLA (sec. con núm. de ident.: 74)	SSNLAWY (sec. con núm. de ident.: 84)	QSVSSN (sec. con núm. de ident.: 90)

Región variable de cadena ligera CDR2	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 75)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 75)	GASTRAT (sec. con núm. de ident.: 75)	LLIYGASTRA (sec. con núm. de ident.: 85)	GAS
Región variable de cadena ligera CDR3	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.: 76)	QQYNNWPR (sec. con núm. de ident.: 86)	QQYNNWPRT (sec. con núm. de ident.: 76)
VH (sec. con núm. de ident.:92): EVQLVESGGGRVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSISSYVKYADSVKGRFTMSRDNAKNSLFLQMNSLRDEDMAVYYCARGHYFDYWGQGLTVTVSS					
Secuencia de ADN que codifica VH (sec. con núm. de ident.:93) GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGAAGAGTGAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTG TGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCTCCGACTACTCCATGAAGTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGG CCTGGAATGGGTGTCCTCTATCTCCTCCATCTCCAGCTACGTGAAGTACGCCGACTCCGTGAAGGG CAGATTACCATGTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTTCTGTCAGATGAACAGCCTGCGCGA CGAGGACATGGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCCACTACTTCGACTACTGGGGACAGGGCACACT GGTCACAGTCTCTTCT					
VL (sec. con núm. de ident.:94): EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVEIK					
Secuencia de ADN que codifica la VL (sec. con núm. de ident.:95) GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCTGTGTCTCCCGGCGAGAGAGCTACCCTGTCT TGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCCTCCAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCTCCC CGGCTGTTGATCTATGGCGCTTCTACCAGAGCCACAGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGC TCTGGCACAGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGTCCGAGGATTTGCGCGTGTACTACTGC CAGCAGTACAACAACCTGGCCCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG					

Tabla 9. Secuencias de NPP3B815

	Aminoácidos
Cadena pesada 1 (1° polipéptido)	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGCAPRRWIYDSSKL ASGVPARFSGSGSGRDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSRNPTFGGGTKVEIK GGGSGGSGGCPPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTRST MHWVKQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCASPQVHYDYAGFPYWCGGLTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (sec. con núm. de ident.:96)
Cadena pesada 2 (2° polipéptido)	EVQLVESGGGRVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SISSYVKYADSVKGRFTMSRDNAKNSLFLQMNSLRDEDMAVYYCARGHYFDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK

	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.:97)
Cadena ligera (3 ^{er} polipéptido)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGAPRLIIYGA STRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNWPRFTGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRFAKVKQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.:98)

Tabla 10. Secuencias de ADN que codifican a NPP3B815

	Aminoácidos
Cadena pesada 1 (1 ^{er} polinucleótido)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGAGTGCTTCTCCAGGCGAG AGAGTGACCCTGTCCTGCTCCGCTTCTCCTCCGTGTCCTACATGAAGTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGCTGCGCCCTAGAAGATGGATCTACGACTCCTCCA AGCTGGCCTCTGGCGTGCCTGCTAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCAGAG ACTATACCCTGACAATCTCCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGTGGTCTAGGAACCCTCCTACCTTTGGCGGAGGCACCAAGGT GGAAATCAAGGGCGGAGGTTCTGGTGGATCTGGCGGATGTCTCCTTGTGG TGGAAGCGGCGGACAGGTTCAAGTGTCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTAC AACCTGGCTCCTCCGTGAAAGTGTCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTAC CAGATCCACCATGCACTGGGTCAAGCAGGCCCCTGGACAAGGCTTGGAGTG GATCGGCTACATCAACCCAGCTCCGCCTACACCAACTACAACCAGAAATTC CAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTACATG GAACTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCT CCTCAGGTTCACTACGACTACGCCGGCTTTCTTATTGGGGCTGTGGCACC CTGGTCACCGTTTCTTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGCC CACCGTGCCCGAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGTGTGCAAGGTGTGCAACAAAGCCCTC GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGTGCAAGGTGTGCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGG ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAA AA (sec. con núm. de ident.:99)
Cadena pesada 2 (2 ^o polinucleótido)	GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGAAGAGTGAAGCCTGGCGGATC TCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCTGGCTTACCTTCTCCGACTACTCCATG AACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCTTGAATGGGTGTCTCTATC TCTCCATCTCCAGCTACGTGAAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTC ACCATGTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTTCTGAGATGAACAGC CTGCGCGACGAGGACATGGCCGTGTACTATTGTGCCAGAGGCCACTACTTC GACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTCTCTTCTGCCTCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG

	GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGT CGAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGGTTACGCAGAAGTCTCTCTC CCTGTCTCCGGGAAAA (sec. con núm. de ident.: 100)
Cadena ligera (3 ^{er} polinucleótido)	GAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCTGTGTCTCCCGGCGAG AGAGCTACCCTGTCTTGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCCTCCAACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCTCCCGGCTGTTGATCTATGGCGCTT CTACCAGAGCCACAGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCA CAGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGTCCGAGGATTTCCGCGTGT ACTACTGCCAGCAGTACAACAACCTGGCCCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCA AGGTGGAAATCAAGCGTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (sec. con núm. de ident.: 101)

6.2 Selección de líneas celulares cancerosas que expresan ENPP3 para la evaluación in Vitro e in Vivo de NPP3B815

La expresión de la superficie de ENPP3 y la densidad del receptor se evaluaron

- 5 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 epítipo similar al brazo aglutinante de ENPP3 dentro de NPP3B815. Como se representa en la Figura 20, la expresión endógena de ENPP3 varió entre negativa (determinada como < límite inferior de detección [LLOD, por sus siglas en inglés], 2969
- 10 receptores/célula) en las líneas celulares Caki1, HEK293T y RXF393 (PDX), baja (<15.000 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

10.600 (VMRCRCW) y 22.000 (HepG2) receptores ENPP3 por célula (Figura 21). 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.

6.3 Unión in vitro de NPP3B815 a células tumorales y células T

La unión celular in vitro de NPP3B815 (NPP3B56xCD3B2030-N106A-spFv) se evaluó en líneas celulares que expresan ENPP3 endógeno alto (A704), medio (VMRCRCW) y negativo (Tabla 11). 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 (Figura 22 y Tabla 12). 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 11: 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 ($\pm$ error estándar de la media) de $177 \pm 18,5$ nM (Figura 22 y Tabla 12). 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 23). 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 23 y Tabla 12). No se observó unión a ninguna de las líneas celulares con el anticuerpo de control de isotipo (79C3B613).

Tabla 12: Valores de EC50 de unión celular para NPP3B815 en células diana y células T.

	EC50 (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.

5

6.4 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 (NPP3B56xCD3B2030-N106A) para inducir la

10 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 13) 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 e

15 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 destrucción contra la línea celular negativa (HepG2 ENPP3-KO) (Figura 24). Como se esperaba, no se observó destrucción de células tumorales mediada por células T con los anticuerpos de control

20 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 13, 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 25). 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 (HepG2 ENPP3-KO) 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 13.

Tabla.

Tabla 13: 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)		
	EC50 (nM)	EC90 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	EC90 (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.

5 **6.5 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 e inducida por NPP3B815 de las líneas celulares positivas para ENPP3, A704 (alta) y VMRCRCW (media) y de la línea celular HepG2 ENPP3-KO negativa para ENPP3 se evaluó en presencia de células T aisladas de 6 donantes humanos sanos diferentes (probados a una relación E:T = 3:1) (Figura 26A). 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 14). 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 14.

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 26B). 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 células T se muestran en la Tabla 15.

- 5 La citotoxicidad inducida por NPP3B815 también se evaluó en relaciones E:T más bajas y más relevantes fisiológicamente de 1:1 y 1:3, y se observó una destrucción dependiente de la dosis en la línea celular A704 con ENPP3 alta, en estas relaciones E:T (Figura 27). 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
- 10 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 14). 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
- 15 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 VMRCRCW de ENPP3 media 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 27).
- 20 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 14.

Tabla 14: 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					
	EC50 (nM) a las 72 h	Destrucción máxima (%) a las 72 hr	EC50 (nM) a las 72 h	Destrucción máxima (%) a las 72 hr	EC50 (nM) a las 120 h	Destrucción máxima (%) a las 120 hr	EC50 (nM) a las 72 h	Destrucción máxima (%) a las 72 hr	EC50 (nM) a las 120 h	Destrucción máxima (%) a las 120 hr
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

ECx, x % concentración efectiva; Máx., máximo; ND, No determinado

Los valores de EC50 y Destrucción máxima no se determinaron si la curva dosis-respuesta no cumplía

- 5 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.

Tabla 15: 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	
	EC50 (nM)	Actividad máxima (%)	EC50 (nM)	Actividad máxima (%)	EC50 (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 EC50 y Actividad 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.

5 **6.6 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, se observó cierta variabilidad en la respuesta entre los donantes (Figura 28). Algunas citoquinas tal como el interferón (IFN)- γ , la interleucina (IL)-2, la IL-10, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés)- α exhibieron una fuerte inducción dependiente de la dosis con el tratamiento con NPP3B815 (Figura 28 y Tabla 16), mientras que otros (IL-1 β , 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-1 β) 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 16: 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

5 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.

10

6.7 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

15 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 29). 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

20 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 29). 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 79C3B615 NullxCD3 en presencia de ninguno de los donantes de PBMC y líneas celulares probadas (Figura 29). La EC50 y los valores máximos de destrucción se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: 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	
	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (nM)	Destrucción máx. (%)	EC50 (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	-	-	-	-

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.

6.8 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 cyno 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 30A y Tabla 18). 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 30B y Tabla 18).

Tabla 18: Sumario de las características moleculares de NPP3B815 y NPP3B847

	Especies	Molécula de herramienta NPP3B847
Aglutinante de CD3		CD3B219
Unión de ENPP3 (basado en células)	PNH	1,6 nM
Unión de CD3 (basada en células)	Humano	4,5 nM
	PNH	5,2 nm

5

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 cyno (Figura 31 y Tabla 19) y se compararon con la actividad del candidato clínico NPP3B815 en presencia de células T humanas.

10

La destrucción celular mediada por células T e inducida por NPP3B847 de la línea celular ENPP3-OE de cyno HepG3-KO se evaluó en presencia de células T de cyno aisladas de 4 donantes diferentes (probadas con una relación E:T = 3:1) (Figura 31). 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 19). 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

15

20

analizados. Además, la destrucción celular mediada por células T inducida por NPP3B847 de la línea celular ENPP3-OE de cyno 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 de control NPP3B41 NullxCD3 con células T humanas (Tabla 19).

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 cyno en una relación E:T de 3:1 (Figura 31). 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 cyno HepG2-KO en una relación E:T = 3:1 (Figura 31). 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 cyno y humanas con NPP3B815 y NPP3B41 se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Sumario 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	
	Citotoxicidad EC50 (nM)				EC50 de activación de células T (nM)				Citotoxicidad EC50 (nM)	EC50 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.

6.9 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 de 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 por vía 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 [ELN ENPP3-00163], 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, por sus siglas en inglés) respectivamente, en comparación con los ratones de control tratados con anticuerpo NullxCD3 en el Día 39 después de la implantación del tumor (Figura 32A). El tratamiento con NPP3B815 a 0,1 y 0,01 mg/kg dio como resultado un 58 % y 42 % de Δ TGI, 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 [ELN ENPP3-00166], 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 Δ TGI respectivamente, en comparación con los ratones de control tratados con el anticuerpo NullxCD3 en el Día 52 después de la implantación del tumor (Figura 33). 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 20.

Tabla 20: Sumario 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	ELN
VMRCRCW SC establecido [Estudio ONC2022-035]	Ratones NSG / donante de células T D204071 Lote 19055100, HemaCare	4 semanas (NPP3B815)	10 (F)	42 % Δ TGI a 0,01 mg/kg; 58 % Δ TGI a 0,1 mg/kg; 75 % Δ TGI a 1 mg/kg; 70 % Δ TGI a 10 mg/kg; q3d-q4d IP para 8 dosis	ENPP3 -00163
HepG2 SC establecido [Estudio P764Y]	Ratones NSG/donante de células T D204071 Lote 19057273, HemaCare	3 semanas (NPP3B194)	10 (F)	104 % Δ TGI a 1 mg/kg, 7 de 9 CR; 90 % Δ TGI a 5 mg/kg, 2 de 8 CR; 38 % Δ TGI a 0,05 mg/kg (ns); q3d-q4d IP para 6 dosis	ENPP3 -00166

5 CR, respuesta completa; F, femenino; IP, intraperitoneal; M, masculino; 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; q3d-q4d, dos veces por semana; SC, subcutáneo; TGI: inhibición del crecimiento tumoral.

p $\leq$ 0,05 frente al control excepto donde se indique como no significativo (ns).

10

EJEMPLO 7. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GUCY2C

7.1 Inmunización de ratones Ablexis Kappa

Se inmunizaron ratones Ablexis Kappa con refuerzos alternos de 10 μ g de dominio extracelular (ECD) GUCY2C de cyno (día 0, 14, 28) o ECD GUCY2C humano (día 7, 21). En algunos casos se usaron nanopartículas de quitosano de zinc en conjunto. Los ratones recibieron 5 refuerzos semanales y un refuerzo final el día 44 con ECD GUCY2C humano (con nanopartículas de quitosano de zinc en algunos casos) y 50 μ g de CD40 antirratón (R&D Systems MAB440).

15

Se recolectaron muestras de suero inmune una vez durante la inmunización (día 28) y se evaluaron para determinar la unión mediante citometría de flujo a células T84 (GUCY2C+) y T84 GUCY2C KO (GUCY2C-). La serología de proteínas se realizó en proteínas ECD GUCY2C humanas y de cyno por MSD. El análisis de la calidad de la respuesta inmune se realizó mediante SPR en chips recubiertos con ECD GUCY2C humano y de cyno.

7.2 Recuperación de células B únicas

El día 51 del programa de inmunización, se extrajeron bazos y ganglios linfáticos inguinales de cada ratón del grupo 4. Todos los ganglios linfáticos se agruparon y homogeneizaron en una suspensión unicelular, se clasificaron en GUCY2C de cyno etiquetado con AF647 doble positivo y GUCY2C humano biotinilado (con detección de estreptavidina-PE). Después las células se sembraron en placas y se cultivaron durante 7 días.

Los sobrenadantes SBC de las células B clasificadas se analizaron mediante MSD de proteína en GUCY2C humano y de cyno biotinilada. Se enviaron resultados primarios para la recuperación del gen V. Los resultados recuperados seleccionados se expresaron como IgG1 humana.

7.3 Transfección y purificación a pequeña escala de Expi293

Los anticuerpos identificados a partir de la campaña de inmunización se clonaron y expresaron como IgG1 humana a una escala de 2 ml y se purificaron. Las células Expi293 se cultivaron en un medio de expresión Expi293 a 37 °C, 7 % de CO₂. Las células se subcultivaron cuando la densidad alcanzó el crecimiento de fase log de

2,5–3 × 10⁶ células viables/ml con una viabilidad de 98-99 %. En el día de transfección, se determinó la densidad celular viable y el porcentaje de viabilidad. Las células se transfectaron a una densidad de 2,5-3 x 10⁶ células viables/ml siguiendo el protocolo de transfección del fabricante (protocolos de sistema de expresión ExpiCHO de ThermoFisher para 24 y 96 bloques de pozo profundo y minitubos de biorreactor). Los cultivos sobrenadantes se recolectaron el Día 5 después de la transfección mediante centrifugación a 2000 RPM durante 15 minutos antes de la purificación. Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes clarificados usando una suspensión de resina Capture Select CH1-XL (Thermo, cat. núm. 2943452050). Los anticuerpos se eluyeron con acetato de sodio 0,1 M, pH 3,5 y cada fracción de elución se neutralizó con Tris HCl 2,5 M, pH 7,5 antes de dializarse en DPBS. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante la medición de la absorbancia a 280 nm en el filtrado usando un instrumento DropSense (Trinean NV/SA).

7.4 Análisis de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos se analizaron para determinar la unión en células T84, CHO-huGUCY2C y EL4-huGUCY2C y se contraanalizaron en EL4 no transfectado en valoraciones de dosis-respuesta. Luego se volvieron a analizar los mejores aglutinantes en valoraciones de dosis-respuesta en CHO-huGUCY2C, CHO-cynoGUCY2C, CHO no transfectado y EL-4 huGUCY2C. También se evaluó la competencia contra los aglutinantes índice GUCY2C y un aglutinante GUCY2C conocido (aglutinante de referencia) para unirse a células CHO-huGUCY2C. Se secuenciaron las regiones variables de los anticuerpos seleccionados. Se seleccionó un mAb llamado GUCYC2_mAb para estudios adicionales.

7.5 Secuencias de GUCY2C_mAb

En las Tablas 21-24, se proporcionan secuencias de GUCY2C_mAb representativas. La Tabla 21 muestra las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de GUCY2C_mAb bajo la delineación de Kabat. La Tabla 22 muestra las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de GUCY2C_mAb bajo la delineación de Chothia. La Tabla 23 muestra las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de GUCY2C_mAb bajo la delineación de ABM. La Tabla 24 muestra las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de GUCY2C_mAb bajo la delineación de Contact. La Tabla 25 muestra las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de GUCY2C_mAb bajo la delineación de IMGT.

Tabla 21. HCDR y LCDR de GUYC2C_mAb bajo la delineación de Kabat.

CDR	Secuencia	Sec. con núm. de ident.
HCDR1	HYYWS	102
HCDR2	RIYTSGSTNYNPSLKS	103
HCDR3	DRYTG YFDL	104
LCDR1	RASQSVSSSYLA	105
LCDR2	GASSRAT	106
LCDR3	QQYGSSPPT	107

Tabla 22. HCDR y LCDR de GUYC2C_mAb bajo la delineación de Chothia.

CDR	Secuencia	Sec. con núm. de ident.
HCDR1	GASISHY	108
HCDR2	YTSGS	109
HCDR3	DRYTG YFDL	104
LCDR1	RASQSVSSSYLA	105

LCDR2	GASSRAT	106
LCDR3	QQYGSSPPT	107

Tabla 23. HCDR y LCDR de GUYC2C_mAb bajo la delineación de ABM.

CDR	Secuencia	Sec. con núm. de ident.
HCDR1	GASISHYYWS	110
HCDR2	RIYTSGSTN	111
HCDR3	DRYTGYFDL	104
LCDR1	RASQSVSSSYLA	105
LCDR2	GASSRAT	106
LCDR3	QQYGSSPPT	107

Tabla 24. HCDR y LCDR de GUYC2C_mAb bajo la delineación de Contact.

CDR	Secuencia	Sec. con núm. de ident.
HCDR1	SHYYWS	112
HCDR2	WIGRIYTSGSTN	113
HCDR3	ARDRYTGYFD	114
LCDR1	SSSYLAWY	115
LCDR2	LLIYGASSRA	116
LCDR3	QQYGSSPP	117

5

Tabla 25. HCDR y LCDR de GUYC2C_mAb bajo la delineación de IMGT.

CDR	Secuencia	Sec. con núm. de ident.
HCDR1	GASISHYY	118
HCDR2	IYTSGST	119
HCDR3	ARDRYTGYFDL	120
LCDR1	QSVSSSY	121
LCDR2	GAS	NA*
LCDR3	QQYGSSPPT	107

La **Tabla 26** muestra las secuencias de aminoácidos de VH1 y VL1 de GUCY2C_mAb. La **Tabla 27** muestra las secuencias de ácido nucleico de VH1 y VL1 de GUCY2C_mAb.

5 **Tabla 26.** Secuencias de aminoácidos de VH1 y VL1 de GUCY2C_mAb

	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
VH1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRRPAGKGLE WIGRIYTSNSTNYNPSLKSRTVSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARDRYTG YFDLWGRGTLTVSS	122
VL1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPPTFGGGTKLEIK	123

Tabla 27. Secuencias de ácido nucleico de VH1 y VL1 de GUCY2C_mAb

	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
VH1	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTT CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCCATC AGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCGGCCCGCCGGGAAGG GACTGGAGTGGATTGGGCGTATCTATACAGTGGGAGCACCAAC TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCGTGTGAGTAGACAC GTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCG CGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGATCGATATACGGGG TACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTC A	124
VL1	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCA GGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTA GCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCAT CCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTC TCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT GTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCCCACTTTTCGGCGGAGGGACC AAGCTGGAGATCAAA	125

CARACTERIZACIÓN DE GUCY2C_mAb

10 Se incubaron tres (3) líneas celulares, una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), CHO transfectado con GUCY2C de cyno y CHO transfectado con

GUCY2C humano, con una valoración de dosis de GUCY2C_mAb durante 60 minutos a 37 °C, se lavaron dos veces y luego se incubaron con AF647 etiquetado como secundario antihumano durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron nuevamente dos veces, se resuspendieron y adquirieron en un citómetro de flujo. La unión de anticuerpos específicos se evaluó en el canal RL1H para cada línea celular. Datos presentados como señal/fondo donde el fondo es sólo secundario. Como se muestra en la **Figura 34**, GUCY2C_mAb generado en la presente se une a ambos GUCY2C humano y de cyno, con mayor afinidad de unión al GUCY2C humano.

Los valores de EC50 para la unión de GUCY2C_mAb a células CHO transfectadas con GUCY2C humano o de cyno se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28.

Células	EC50
CHO-huGUCY2C	4,6 nM
CHO-cynoGUCY2C	8,7 nM

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS PARA GUCY2CxCD3

7.6 Diseño de anticuerpos biespecíficos GUCY2CxCD3

En este ejemplo, se generaron dos (2) anticuerpos biespecíficos para GUCY2CxCD3 (GUCY2CxCD3_biAb-1 y GUCY2CxCD3_biAb-2).

GUCY2CxCD3_biAb-1 y GUCY2CxCD3_biAb-2 comprenden el mismo brazo de unión a GUCY2C, que corresponde al GUCY2C_mAb descrito anteriormente y un brazo de unión a CD3 de afinidad media y alta, respectivamente.

7.7 Diseño de GUCY2CxCD3_biAb-1

Brevemente, el brazo de unión a GUCY2C de GUCY2CxCD3_biAb-1 comprende un Fab anti-GUCY2C (GUCY2C_Fab) derivado de GUCY2C_mAb descrito en el Ejemplo 1. Para preparar el anticuerpo biespecífico, se diseñaron por ingeniería VH1 y VL1 de GUCY2C_mAb en formatos VH1-CH1-hinge-CH2-CH3 (cadena pesada 1, HC1) y VL1-CL (cadena ligera 1, LC1) respectivamente y se expresaron como IgG1. La mutación de silenciamiento de Fc L234A/L235A/D265S se introdujo en la región Fc de HC1. También se diseñaron por ingeniería mutaciones diseñadas para promover la heterodimerización selectiva (mutación “ojal” T366S, L368A e Y407V) en el dominio Fc de HC1.

El brazo de unión a CD3 de GUCY2CxCD3_biAb-1 comprende un dominio scFv estabilizado (o engrapado) descrito en la presente descripción como spFv-1. El brazo CD3 de GUCY2CxCD3_biAb-1 es un brazo de unión a CD3 de afinidad media-baja que en la presente descripción se denominará CD3_spFv-1. El CD3_spFv-1 se deriva de un fragmento scFv anti-CD3 descrito en WO2022/201053, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

El scFv anti-CD3 como se describe en WO2022/201053 se diseñó por ingeniería en un scFv estabilizado (en la presente descripción denominado “scFv engrapado” o spFv) restringiendo la estructura del scFv, sin impactar negativamente, los movimientos relativos entre la VH2 y la VL2. El scFv estabilizado se generó mediante ingeniería de enlaces disulfuro entre la VH2 y el enlazador y entre la VL2 y el enlazador. Se identificaron dos posiciones marco expuestas en la superficie estructuralmente conservadas (puntos de anclaje) que no participan en la unión del antígeno, una en la VH2 en la posición H105 y otra en la VL2 en la posición L42, y se mutaron en residuos de cisteína (Cys) para generar la VH2 de la sec. con núm. de ident.: 17 y VL2 de la sec. con núm. de ident.: 18. Se usó un enlazador flexible de la secuencia

GGGSGGSGGCPPCGGSGG (sec. con núm. de ident.: 2) que comprende dos residuos Cys para conjugar VL2 y VH2 en el formato VL-enlazador-VH (LH). La distancia y ubicación de los residuos Cys del enlazador y los residuos Cys de la VH2 y la VL2 es crítica para la formación de los enlaces disulfuro entre los residuos Cys del enlazador y cada punto de anclaje de la VH2 y la VL2.

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 mutación de silenciamiento de Fc L234A/L235A/D265S y la heterodimerización (mutación “botón” T366W) se diseñaron por ingeniería en el dominio Fc de HC2.

Después se emparejó HC2 que comprende CD3_spFv-1 se emparejó con HC1 y LC1 que comprende el GUCY2C_Fab usando la tecnología de heterodimerización de botón en ojal para generar el GUCY2CxCD3_biAb-1 engrapado.

Las secuencias de CDR, VH2, VL2 y la secuencia spFv de CD3-spFv-1 se muestran en la Tabla 29-31.

Tabla 29. HCDR y LCDR de CD3_spFv-1 bajo la delineación de Kabat.

CDR	Secuencia	Sec. con núm. de ident.
HCDR1	RSTMH	126
HCDR2	YINPSSAYTNYNQKFQG	127
HCDR3	PQVHYDYAGFPY	128
LCDR1	SASSSVSYMN	129
LCDR2	DSSKLAS	130
LCDR3	QQWSRNPPT	131

Tabla 30. Secuencias de aminoácidos de VH2, VL2 y VL-enlazador-VH engrapado de CD3_spFv-1

	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
VH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTRSTMHWVK QAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTS TAYMELSSLRSED TAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGT LVTVSS	132
VL2	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKP GCAPRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDYTLTISSLE PEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGKVEIK	133
VL2-enlazador-VH2 engrapado	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKP GCAPRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDYTLTISSLE PEDFAVYYCQQWSRNPPTFGGGKVEIKGGGSGGSGG CPPCGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTF TRSTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGR VTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASPQVHYDYA GFPYWGCGTL VTVSS	134

Tabla 31. Secuencias de nucleótidos de VH2, VL2 y VL-enlazador-VH engrapado de CD3_spFv-1

	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
VH2	CAAGTACAACCTTGTTCATCTGGCGCTGAAGTCAAAA AACCCGGATCTAGTGTTAAAGTTTCATGTAAGGCATC AGGCTATACTTTCACTCGGTCTACAATGCACTGGGTC AAGCAGGCTCCAGGGCAAGGTTTGGAATGGATAGGG TACATAAATCCTTCTAGCGCCTATACTAATTACAACCA GAAGTTTCAGGGACGTGTTACTCTGACTGCTGACAAA TCAACATCTACAGCCTATATGGAAGTGTCTTCATTGAG GAGTGAGGACACTGCTGTGTATTACTGCGCTTCTCCT CAGGTGCACTATGATTACGCTGGCTTTCCCTACTGGG GTTGTGGCACCCCTCGTCACCGTTTCATCT	135
VL2	GAGATCGTCTTGACTCAGTCCCCTGCAACCCTCAGCG CAAGTCCCGGAGAGCGCGTTACATTGAGTTGTTCCG CATCCAGTTCAGTCAGCTACATGAACTGGTACCAACA AAAGCCCGGTTGTGCTCCAAGAAGGTGGATCTATGAT TCCAGTAAGCTGGCCTCCGGGGTCCCAGCAAGGTTT AGCGGTTCCGGCAGCGGAAGGGACTACACTCTGACC ATAAGTTCCCTTGAACCAGAAGACTTCGCCGTCTATT ATTGTCAGCAGTGGTCCCGAAATCCACCTACCTTCGG GGGCGGCACTAAAGTGGAGATTAAA	136
VL2-enlazador-VH2 engrapado	GAGATCGTCTTGACTCAGTCCCCTGCAACCCTCAGCG CAAGTCCCGGAGAGCGCGTTACATTGAGTTGTTCCG CATCCAGTTCAGTCAGCTACATGAACTGGTACCAACA AAAGCCCGGTTGTGCTCCAAGAAGGTGGATCTATGAT TCCAGTAAGCTGGCCTCCGGGGTCCCAGCAAGGTTT AGCGGTTCCGGCAGCGGAAGGGACTACACTCTGACC ATAAGTTCCCTTGAACCAGAAGACTTCGCCGTCTATT ATTGTCAGCAGTGGTCCCGAAATCCACCTACCTTCGG GGGCGGCACTAAAGTGGAGATTAAAGGAGGAGGTAG	137

	TGGCGGCTCCGGTGGATGTCCTCCTTGCGGAGGATC AGGAGGTCAAGTACAACCTTGTTCATCTGGCGCTGAA GTCAAAAAACCCGGATCTAGTGTTAAAGTTTCATGTAA GGCATCAGGCTATACTTTCACTCGGTCTACAATGCAC TGGGTCAAGCAGGCTCCAGGGCAAGGTTTGGAATGG ATAGGGTACATAAATCCTTCTAGCGCCTATACTAATTA CAACCAGAAGTTTCAGGGACGTGTTACTCTGACTGCT GACAAATCAACATCTACAGCCTATATGGAAGTGTCTTC ATTGAGGAGTGAGGACACTGCTGTGTATTACTGCGCT TCTCCTCAGGTGCACTATGATTACGCTGGCTTTCCCT ACTGGGGTTGTGGCACCTCGTCACCGTTTCATCT	
--	---	--

Las secuencias de aminoácidos de longitud completa de GUCY2C-CD3-bisp-Ab1 se muestran en la Tabla 32-33. La Tabla 32 muestra las secuencias de aminoácidos de longitud completa del brazo GUCY2C (HC1 y LC1) y del brazo CD3 (HC2). La Tabla 33 muestra las secuencias de ácido nucleico del brazo GUCY2C (HC1 y LC1) y del brazo CD3 (HC2).

Tabla 32. Secuencia de aminoácidos de longitud completa de GUCY2CxCD3 bisp-Ab1

	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
HC1, (brazo de unión de GUCY2C)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRRPAG KGLEWIGRIYTSNSTNYNPSLKSRTVSVSDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARDRYTG YFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	138
LC1, (brazo de unión de GUCY2C)	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC	139
HC2, (brazo de unión de CD3)	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPG CAPRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDTLTISLLEPED FAVYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGSGSGSGGCPPCG GSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTRSTMH WVKQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGT	140

	LVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
--	--	--

Tabla 33. Secuencia de ácido nucleico de longitud completa de GUCY2CxCD3 bisp-

Ab1

	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
HC1, (brazo de unión de GUCY2C)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGG TGCCTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCG GCCCCGCCGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATCT ATACCAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGA GTCGAGTCACCGTGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG GCCGTATATTACTGTGCGAGAGATCGATATACGGGGTAC TTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCC TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACCTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCAC CTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGTCCTGCGCGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTCAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGGTT CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAA	141
LC1, (brazo de unión de GUCY2C)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTG TCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAG TCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTG CATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGT	142

	GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCA GCAGTATGGTAGCTCACCTCCCACCTTTCGGCGGAGGGA CCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	
HC2, (brazo de unión de CD3)	GAGATCGTCTTGACTCAGTCCCCTGCAACCCTCAGCGCA AGTCCCGGAGAGCGCGTTACATTGAGTTGTTCCGCATCC AGTTCAGTCAGCTACATGAACTGGTACCAACAAAAGCCC GGTTGTGCTCCAAGAAGGTGGATCTATGATTCCAGTAAG CTGGCCTCCGGGGTCCCAGCAAGGTTACGCGGTTCCGG CAGCGGAAGGGACTACACTCTGACCATAAGTTCCCTTGA ACCAGAAGACTTCGCCGTCTATTATTGTCAGCAGTGGTC CCGAAATCCACCTACCTTCGGGGGCGGCACTAAAGTGG AGATTAAGGAGGAGGTAGTGGCGGCTCCGGTGGATGT CCTCCTTGCGGAGGATCAGGAGGTCAAGTACAACCTGTT CAATCTGGCGCTGAAGTCAAAAAACCCGGATCTAGTGT AAAGTTTCATGTAAGGCATCAGGCTATACTTCACTCGGT CTACAATGCACTGGGTCAAGCAGGCTCCAGGGCAAGGT TTGGAATGGATAGGGTACATAAATCCTTCTAGCGCCTATA CTAATTACAACCAGAAGTTTCAGGGACGTGTTACTCTGA CTGCTGACAAATCAACATCTACAGCCTATATGGAAGTGC TTCATTGAGGAGTGAGGACACTGCTGTGTATTACTGCGC TTCTCCTCAGGTGCACTATGATTACGCTGGCTTTCCCTAC TGGGGTTGTGGCACCCCTCGTCACCGTTTTCTGAGCCC AAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGTCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	143

7.8 Diseño de GUCY2CxCD3_biAb-2

El brazo de unión a GUCY2C de GUCY2CxCD3_biAb-2 es el mismo que para GUCY2CxCD3_biAb-1 descrito anteriormente.

El brazo de unión a CD3 de GUCY2CxCD3_biAb-2 es un brazo de unión a CD3 de alta afinidad en un formato spFv y en la presente descripción se denominará anti-CD3 spFv-2 (CD3_spFv-2). El scFv engrapado en el VL-enlazador-VH se diseñó por ingeniería además en una Cadena Pesada 2 (HC2) y se expresó como IgG1 que comprende la mutación de silenciamiento de Fc L234A/L235A/D265S y la heterodimerización (mutación “botón” T366W) en el dominio Fc. Después se emparejó HC2 que comprende CD3_spFv-2 con la HC1 y la LC1 que comprende el GUCY2C_Fab usando la tecnología de heterodimerización de botón en ojal para generar el GUCY2CxCD3_biAb-2 engrapado.

7.9 Expresión de anticuerpos GUCY2CxCD3

Los anticuerpos biespecíficos para GUCY2CxCD3 se expresaron en células ExpiCHO-S (ThermoFisher; Cat. núm. A29127) mediante transfección transitoria con ADN plasmídico purificado que codifica LC1, HC1 y HC2 usando el kit de transfección ExpiFectamine CHO (ThermoFisher; cat. núm. A29131). Las células ExpiCHO-S se mantuvieron en suspensión en ExpiCHO Expression Medium (ThermoFisher; cat. núm. A2910001) en una incubadora con agitación orbital ajustada a 37 °C, 8 % de CO₂ y 125 rpm. Las células se pasaron a 4 matraces de Erlenmeyer estériles, ventilados y sin deflectores (Corning 431255) con un volumen de cultivo inicial de 400 ml por matraz.

El día de la transfección (día de cultivo 0), los cultivos en matraz tenían entre 5,15 y 8,99 × 10⁶ células viables/ml con una viabilidad mínima del 98,2 %. Para la transfección, se diluyeron 200 µg de ADN plasmídico que codifica HC2, 200 µg de ADN

plasmídico que codifica HC1 y 400 µg de ADN plasmídico que codifica LC1 (relación de cadena HC2:HC1:LC1 a 1:1:2) en 64 ml de medio OptiPRO (ThermoFisher, cat. núm. 12309019). Se diluyeron 5,12 ml de reactivo de transfección ExpiFectamine CHO en otros 64 ml de medio OptiPRO. La mezcla de ADN plasmídico más medio OptiPRO y el
 5 reactivo ExpiFectamine CHO más la mezcla de medio OptiPRO se combinaron y se incubaron a temperatura ambiente durante un minuto. Después, esto se distribuyó de manera equivalente en los 4 matraces de células, ~33 ml/matraz. Las células transfectadas se devolvieron a la incubadora con agitación orbital.

Después de la incubación durante la noche (día de cultivo 1), se combinaron
 10 240 ml de alimento ExpiCHO y 4,8 ml de potenciador de CHO ExpiFectamine y después se distribuyeron de manera equivalente en los 4 matraces. Las células se incubaron adicionalmente hasta la recolección (día de cultivo 7). El sobrenadante del cultivo de las células transfectadas transitoriamente ($6,06 \times 10^6$ células viables/ml, 84,7 % de viabilidad) se aclaró mediante centrifugación (15 min 5000 rpm (5316 RCF))
 15 seguido de filtración de 0,2 µm.

7.10 Purificación de anticuerpos GUCY2CxCD3

Los anticuerpos biespecíficos para GUCY2CxCD3 se purificaron de la siguiente manera. El sobrenadante del cultivo celular filtrado preparado anteriormente se cargó
 20 en una columna MabSelect PrismaA personalizada de 60 ml preequilibrada (1× DPBS, pH 7,2) a 20 ml/min usando un AKTA Pure150. Después de la carga, la columna se lavó con 1× DPBS, pH 7,2 hasta que el UV se estabilizó cerca del valor inicial. La proteína se eluyó con acetato de sodio 0,1 M, pH 3,45, y se neutralizó en línea mediante la adición de Tris HCl 2,5 M, pH 7,5 al 10 % (v/v) del volumen final, se filtró

(0,2 μ m) y se dializó en MES 20 mM, pH 5,5. El eluato dializado se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEX) usando una columna Capto S ImpAct personalizada (GE Healthcare, 2,6 cm $\times$ 36 cm, CV = 193 ml) preequilibrada en regulador A (MES 20 mM, pH 6,5). La proteína se cargó a 10 ml/min y luego se eluyó de la columna con un gradiente de regulador B (MES 20 mM, pH 6,5, NaCl 1 M: 0 – 5 % de regulador B durante 10 min, 5 – 35 % de regulador B durante 135 min). Las fracciones de los picos que contenían sólo proteína monomérica se agruparon, se dializaron en 1 $\times$ dPBS, PH 7,2 y se filtraron (0,2 μ m).

CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS PARA GUCY2CxCD3

7.11 Especificidad de unión a células tumorales y especificidad de unión a células T

Se realizaron estudios de unión celular de una hora mediante citometría de flujo a una temperatura fisiológicamente relevante (37 °C) en anticuerpos biespecíficos para GUCY2CxCD3 (GUCY2CxCD3_biAb-1 y GUCY2CxCD3_biAb-2), anticuerpo biespecífico (biAb) para GUCY2CxCD3 de referencia conocido y moléculas de control Null $\times$ CD3. El objetivo era caracterizar y cuantificar la unión celular específica para GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2. Como se muestra en la **Figura 35A**, GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2 mostraron una unión fuerte y específica a la línea celular T84 que expresa GUCY2C endógenamente. La unión máxima de GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2 fue mayor que la del biAb de referencia. El control Null $\times$ CD3 no se unió a T84.

GUCY2CxCD3_biAb-1 se unió a las células T primarias en un grado similar al Null $\times$ CD3, lo que sugiere que no hay impacto del brazo de unión a GUCY2C Fab en la participación de la célula T. GUCY2CxCD3 biAb-2, que porta un aglutinante de CD3 de

mayor afinidad, se unió a las células T primarias con mayor potencia que GUCY2CxCD3-biAb-1 o NullxCD3 (**Figura 35B**). El biAb de referencia también se unió a las células T como se esperaba.

Los valores de EC50 para la unión de GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2 a células T84 y

5 células T se resumen en la Tabla 34.

Tabla 34.

Anticuerpo biespecífico	EC50 a T84	EC50 a células T
GUCY2CxCD3 biAb-1	12 nM	108 nM
GUCY2CxCD3 biAb-2	12 nM	4,9 nM
BiAb de referencia	4,6 nM	180 nM

7.12 Comparación de epítomos

Para determinar si el aglutinante GUCY2C en GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2 comparte el mismo epítipo que el biAb de referencia, se realizaron experimentos de citometría de flujo de competencia usando GUCY2C mAb parentales de los cuales se derivaron GUCY2CxCD3_biAb-1, GUCY2CxCD3_biAb-2 y Ab de referencia. Con ese fin, se tiñeron las células CHO transfectadas con GUCY2C humano con mAb de referencia etiquetado con AF647 junto con una valoración de GUCY2C mAb no etiquetado del que se derivan GUCY2CxCD3 biAb-1 y 2. Después, se lavaron las

10 placas y entonces se detectó el mAb de referencia etiquetado con AF647 unido en un citómetro de flujo. Como se muestra en la **Figura 36**, el GUCY2C mAb no etiquetado no compitió con el mAb de referencia etiquetado con AF647 por la unión, mientras que el biAb de referencia no etiquetado sí lo hizo. Esto indica que el epítipo del aglutinante GUCY2C en GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2 es distinto del epítipo del mAb de referencia.

7.13 Destrucción in vitro y activación de células T

Los ensayos de citotoxicidad basados en impedancia realizados en la plataforma RTCA xCELLigence (Agilent) fueron el medio principal usado para caracterizar la potencia in vitro de los anticuerpos biespecíficos GUCY2CxCD3 (GUCY2CxCD3_biAb-1 y GUCY2CxCD3_biAb-2), el anticuerpo biespecífico GUCY2CxCD3 de referencia (biAb) y moléculas de control Null×CD3. Los experimentos realizados en el sistema de imágenes de células vivas en tiempo real IncuCyte® S3 (Sartorius) se investigaron como una lectura ortogonal. Se evaluaron las líneas celulares de CRC HT55, LS1034 y T84. Ellas expresan GUCY2C en un rango de 15.000-40.000 receptores/célula, caracterizado como un nivel medio de GUCY2C. Para aproximarse lo mejor posible a la relevancia fisiológica en el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés), se usaron las relaciones E:T donde se alcanzó la citotoxicidad máxima para la identificación y caracterización.

Como se muestra en la **Figura 37**, GUCY2CxCD3_biAb-1 indujo citotoxicidad mediada por células T y activación de células T en una relación E:T de 1:1 para T84 y una relación E:T de 3:1 para las células HT55 y LS1034. GUCY2CxCD3_biAb-2 también indujo citotoxicidad mediada por células T y activación de células T contra estas líneas celulares, pero mostró un efecto gancho en concentraciones altas. El biAb de referencia mostró una citotoxicidad mediada por células T y una activación de células T más débiles que GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2. El control nullxCD3 spFv no mostró citotoxicidad mediada por células T significativa ni activación de células T contra estas líneas celulares.

Los valores EC50 se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35.

EC50 (nM) de destrucción tumoral			
Nombre del Ab	HT-55	LS1034	T84
GUCY2CxCD3-biAb-1	0,8	0,04	n/a
GUCY2CxCD3-biAb-2	n/a	0,007	0,03
BiAb de referencia	1,1	0,3	0,7

Abreviaturas: n/a = no aplicable porque el ajuste de la curva era ambiguo y no permitía un cálculo preciso de los valores de EC50

7.14 Eficacia antitumoral en un modelo HT55 CDX humanizado de células T

5 La actividad antitumoral y la relación PD de GUCY2CxCD3_biAb-1 se evaluaron en los modelos establecidos de Xenoinjerto derivado de línea celular (CDX) colorrectal humana HT55 SC en ratones hembra NSG inmunocomprometidos (es decir, inmunodeficiencia combinada grave [scid] diabética no obesa [NOD, por sus siglas en inglés] gamma o NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) humanizados con células pan-T
10 CD3+ de donante humano.

Los ratones que portan xenoinjertos SC HT55 establecidos se dosificaron por vía intraperitoneal (IP) con GUCY2CxCD3 biAb-1 dos veces por semana a 0,5, 1 y 5 mg/kg, o DPBS durante un total de 8 dosis (n=10/grupo). Se observó una eficacia antitumoral significativa con el tratamiento con GUCY2CxCD3 biAb-1 a 0,5, 1 y 5 mg/kg
15 con 109 % Δ de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en los 3 niveles de dosis ($p \leq 0,0001$; **Figura 38**), en comparación con el grupo de control tratado con DPBS el Día 33 después de la implantación del tumor. Esto dio como resultado una regresión tumoral (TR) del 100 % y 10 de 10 regresiones completas (CR) en cada grupo de tratamiento al final del estudio.

20 7.15 Estabilidad conformacional

La estabilidad térmica del GUCY2CxCD3_biAb-1 se caracterizó mediante microcalorímetro capilar VP-DSC (Malvern Panalytical Malvern, Reino Unido). Los escaneos de temperatura se realizaron de 25 a 100 °C por duplicado. Una exploración de referencia de regulador se sustrajo de la exploración de proteína y la concentración de proteína se normalizó antes del análisis termodinámico. Los datos se graficaron y analizaron usando el software MicroCal PEAQ. La curva de DSC se ajustó usando un modelo que no era de dos estados para obtener los valores de entalpía y temperatura(T_m) de transición aparente. GUCY2CxCD3_biAb-1 mostró buena estabilidad térmica (Tabla 36).

Tabla 36.

Tonset	62,7 °C
Tms (T _{m1} , T _{m2} , T _{m3})	71,8, 76,3 y 90,7 °C

7.16 Estudio exploratorio de toxicidad

El brazo GUCY2C de GUCY2CxCD3-biAb-1 tiene reactividad cruzada con mono cynomolgus, pero su brazo de unión a CD3 es específico de humanos y carece de reactividad cruzada con mono. Por lo tanto, para este estudio se preparó un biespecífico GUCY2CxCD3 (GUCY2CxCD3_biAb-3) con reactividad cruzada tisular en mono cynomolgus. GUCY2CxCD3-biAb-3 se preparó como se describe anteriormente para GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2. GUCY2CxCD3_biAb-3 comprende el mismo brazo GUCY2C Fab (HC1 y LC1) que GUCY2CxCD3_biAb-1 y 2, pero comprende un brazo de unión a CD3 diferente también en formato spFv pero con reactividad cruzada con CD3 de cyno. El brazo CD3 de GUCY2CxCD3-biAb-3 se denomina en la presente descripción CD3_spFv-3. La afinidad de unión del brazo CD3 de reacción cruzada de

CD3_spFv-3 del mono cynomolgus es de 2 a 5 veces mayor que la del CD3_spFv-1 de GUCY2CxCD3-biAb-1. La mayor afinidad de unión a CD3 puede dar como resultado un mayor nivel de liberación de citocinas que el que se observaría de otro modo con GUCY2CxCD3-biAb-1. Sin embargo, GUCY2CxCD3-biAb-3 sigue siendo una molécula

5 sustituta apropiada en el mono cynomolgus para modelar la farmacología y cualquier toxicidad potencial asociada resultante de la administración de GUCY2CxCD3-biAb-1 en humanos.

Se evaluaron tres (3) niveles de dosis crecientes (0,03, 0,3 y 1,2 mg/kg) con GUCY2CxCD3_biAb-3 para evaluar el nivel de dosis tóxica de GUCY2CxCD3_biAb-1.

10 Cada dosis se administró dos veces (1 vez por semana) durante 2 semanas a 1 mono por sexo por grupo.

Los resultados muestran que todas las dosis se toleraron (HNSTD=1,2 mg/kg). No se observó mortalidad ni cercanía a la muerte. Los signos clínicos incluyeron emesis transitoria en el grupo tratado con la dosis más alta (1,2 mg/kg) solo después

15 de la primera dosis (día 1), donde no se necesita intervención, y no se observó emesis después de la administración de la segunda dosis (día 8). El GUCY2CxCD3_biAb-3 (que contiene el aglutinante GUCY2C de la solicitud) mostró menos efectos secundarios no deseados (tal como uno o más de entre emesis, temperatura corporal elevada, disminución de la actividad, postura encorvada, reducción del apetito;

20 deshidratación, pérdida de peso corporal ($\leq 7\%$) y heces blandas o líquidas) que el biAb de referencia.

EJEMPLO 8: ANTICUERPOS CLAUDIN CD3 SPFV

8.1 Ingeniería de anticuerpos CLDN18.2xCD3

Las moléculas de unión CD3 VH-Enlazador-VL o VL-Enlazador-VH scFv o moléculas VL-Enlazador-VH spFv se diseñaron por ingeniería adicionalmente como IgG1 en un formato scFv-bisagra CH2-CH3, o en un formato spFv-bisagra-CH2-CH3 que comprende mutación silenciadora de Fc (L234A/L235A/D265S) y mutaciones de dimerización para promover la heterodimerización de las cadenas pesadas CLDN18.2 y CD3 y la generación de anticuerpos CLDN18.2xCD3.

Las regiones VH y VL específicas de CLDN18.2 se diseñaron por ingeniería en los formatos VH-CH1-bisagra-CH2-CH3 y VL-CL respectivamente y se expresaron como IgG1. La mutación de silenciamiento de Fc L234A/L235A/D265S se introdujo en la región Fc. Las mutaciones diseñadas para promover la heterodimerización selectiva también se diseñaron por ingeniería en el dominio CLDN18.2 Fc.

Tabla 37. Secuencia de aminoácidos de longitud completa del brazo CD3 del Ab

biespecífico CLDN18.2xCD3

Nombre de CLDN18.2xCD3 biespecífico	Secuencia del brazo CD3 (CD3B2030_N106A-spFv-LH)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab1	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGC APRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDTLTISSELEPEDFA VYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGSGGCPPCGGS GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTRSTMHWVK QAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGLTVTVSS (sec. con núm. de ident.:144)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab2	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGC APRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDTLTISSELEPEDFA VYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGSGGCPPCGGS GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTRSTMHWVK QAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGLTVTVSS (sec. con núm. de ident.:145)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab3	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGC APRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDTLTISSELEPEDFA VYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGSGGCPPCGGS

	GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVK QAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGLTVTVSS (sec. con núm. de ident.:146)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4	EIVLTQSPATLSASPGERVTLSCSASSSVSYMNWYQQKPGC APRRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGRDTLTISSEPEDFA VYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIKGGGSGGSGGCGPPCGGS GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRSTMHWVK QAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCASPQVHYDYAGFPYWGCGLTVTVSS (sec. con núm. de ident.:147)

Tabla 38. Secuencia de aminoácidos de longitud completa del brazo CLDN18.2 de las secuencias biespecíficas CLDN18.2xCD3

Nombre de CLDN18.2xCD3 biespecífico	HC	LC
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC AASGFIFSNYYMAWVRLAPGKG LEWVSSISIGGGKSSYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHPQLGPNPFDYW GQGT LVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVS VSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRT QKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.:148)	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSVTISS VDLMN WYQQKPGKAP KLLIYRASNLASGIPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSRESP YTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNR GEC (sec. con núm. de ident.: 149)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC AASGFIFSNYYMAWVRLAPGKG LEWVSSISIGGGKSHYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHPSLGNPFDYW GQGT LVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVS VSHEDPEVKFNWYVDGVE	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSVTISS VDLMN WYQQKPGKAP KLLIYRASNLASGIPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSRESP YTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNR

	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRFT QKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.:150)	GEC (sec. con núm. de ident.:151)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFIFSNYYMAWVRLAPGKG LEWVSSISIGGGKSHYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHPQSGPNPFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVSVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRFT QKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.:152)	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSVTISS VDLMNWWYQKPGKAP KLLIYRASNLASGIPSRF SGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSRESP YTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGT ASVCLLNNFYPRKAKV QWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNR GEC (sec. con núm. de ident.:153)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFIFSNYYMAWVRLAPGKG LEWVSSISIGGGKSHYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHPQLGPNPFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVSVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRFT QKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.:154)	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSVTISS VDLMNWWYQKPGKAP KLLIYRASNLASGIPSRF SGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSRESP YTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGT ASVCLLNNFYPRKAKV QWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNR GEC (sec. con núm. de ident.:155)

8.2 Unión del biespecífico a células por citometría de flujo

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos CLDN18.2xCD3 purificados para unirse a líneas celulares que expresan CLDN18.2 endógeno (SK-CO-1). SK-CO-1 es una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano, NUGC-4 es una línea celular derivada de un carcinoma de células de anillo de sello de estómago. El DMS 454 es una línea celular derivada de un carcinoma pulmonar de células pequeñas. NCI-H146 es una línea celular derivada del cáncer de pulmón. La GSU es una línea celular derivada del carcinoma gástrico. Todas las líneas celulares expresan claudina humana 18.2 a niveles variables.

Las células SK-CO-1 y las células DMS 454 se suspendieron en tubos cónicos de 50 ml a 20-22 millones de células por tubo cónico de 50 ml. Para multiplexar el análisis de citometría de flujo, las células SK-CO-1 se tiñeron con 0,02 μ M de CFSE, las células DMS 454 se tiñeron con 0,2 μ M de CTV y las células NUGC-4 se mantuvieron sin teñir. Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz y se centrifugaron durante 5 minutos a 400xg. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en HI FBS a $\sim 1,5 \times 10^6$ células/ml para apagar las reacciones de tinción. Todas las células se resuspendieron en medio fresco a $\sim 1,5 \times 10^6$ células/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de células SK-CO-1 teñidas con CFSE, células DMS 454 teñidas con CTV y células SK-CO-1 no teñidas y se plantaron 50 μ l de células mixtas por pocillo en placas de ensayo (~ 25 k células/cada línea celular; ~ 75 k/total de células mixtas/pocillo). Se usaron el mAb humano de transferrina antihumana y el isotipo IgG1_AAS humano (bivalente) como controles positivos y negativos, respectivamente. Se añadieron 50 μ l de titulaciones de CLDN18.2xCD3 a 2X concentración en cada pocillo que contenía células y se

incubaron durante una hora a 37 °C. Se añadieron 150 µl de regulador de tinción a cada pocillo después de una hora de incubación. Las placas se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos para peletizar las células. Se añadieron de nuevo 150 µl de regulador de tinción a cada pocillo y la placa se centrifugó a 500xg durante 5 minutos para peletizar las células. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 50 µl de anticuerpo de detección secundaria específico de IgG Fc antihumano conjugado A647 (Jackson ImmunoResearch) a 2 µg/ml en regulador de tinción a cada pocillo. Las placas se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Se añadieron 150 µl de regulador de corrida IntelliCyt a los pocillos y la placa se centrifugó a 500xg durante 5 minutos para peletizar las células y se retiró el sobrenadante. Después se resuspendieron las células en 35 µl de regulador de corrida y las placas se analizaron en un iQue Screener (Sartorius). Brevemente, las células se segmentaron en FCS vs. SCS para eliminar los residuos. Los singletes se bloquearon en la gráfica de puntos SCS-A vs SCS-H. Las células se bloquearon en los canales BL1-H y VL1-H para separar las 3 poblaciones de células. Las células se evaluaron para unión celular de los mAb de control o los sobrenadantes del panel de prueba al comparar la unión de control negativo/isotipo por RL1-H (A647) Geomeans de la población de células vivas. Las curvas de respuesta a la dosis se generaron usando 4 parámetros ajustados a los niveles calculados de EC50 y de unión máxima que se muestran en la Tabla 39.

20

Tabla 39. Unión de anticuerpos CLDN18.2xCD3 a células SK-CO-1

Nombre del anticuerpo de CLDN18.2xCD3	EC50 a células SK-CO-1 (nM)
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab1	12,7
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4	41,3

CLDN18.2xCD3 bisp-Ab2	193,3
CLDN18.2xCD3 bisp-Ab3	228,7

La unión dependiente de la concentración de CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 a las células NCI-H146 y GSU se evaluó a 37 °C después de 1 h de incubación en un rango de 0 – 1 uM (doce diluciones triples).

5 Las células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se resuspendieron en medio de ensayo completo antes de ser transferidas a matraces de cultivo. Las células usadas para este experimento se mantuvieron en cultivo activo, se pasaron al menos dos veces y fueron > 90 % viables al inicio del ensayo. El ensayo cinético de unión celular se inició al añadir 200 µl de células y 200 µl de anticuerpo en cada pocillo

10 de una placa profunda de 2 ml de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C. En cada punto de tiempo, se retiró una alícuota de 50 µl y se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo redondo que contenía regulador FACS frío. Las células se lavaron dos veces con regulador FACS y se resuspendieron en 50 µl de regulador FACS que contenía fragmento de anticuerpo secundario AF 647 F(ab')₂ de IgG antihumana de cabra a

15 6 µg/ml. El anticuerpo secundario se incubó con células durante 30 min a 4 °C protegido de la luz. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con regulador FACS frío y después se resuspendieron en regulador FACS que contenía 0,1 % de ácido plurónico, 2 mM de EDTA y Sytox Green (diluido 1:1000) para etiquetar todas las células muertas. La tinción se analizó de inmediato en el Intellicyt iQue3

20 (Sartorius). Las células NuGC-4 CLDN 18.2 KO sirvieron como línea celular negativa en este experimento y confirmaron la especificidad para CLDN 18.2. Las curvas dosis-respuesta representativas se exhiben en las Figuras 39-42. Las EC50 ajustadas para la unión de CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 a las líneas celulares tumorales también se

muestran en la Tabla 40. CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 mostró una unión específica dependiente de la dosis que fue consistente con las densidades del receptor en cada línea celular diana en comparación con las células inactivadas CLDN 18.2.

- 5 Tabla 40: Parámetros de unión de CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 a líneas celulares tumorales endógenas

	NCI-H146	GSU	NuGC-4	NuGC-4 CLDN 18.2 KO
EC50 (nM)	23	74	N/A*	N/A*

*Nota: Valores de EC50 no asignados debido a la falta de saturación de las curvas de respuesta a la dosis

10 8.3 Análisis de estabilidad de anticuerpos CLDN18.2xCD3

Se evaluó la estabilidad de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 como se describe a continuación.

8.3.1 Calorimetría diferencial de barrido de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4

La estabilidad térmica del anticuerpo CLDN18.2xCD3 C18B1068 y

- 15 CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 se caracterizó mediante microcalorímetro capilar VP-DSC (Malvern Panalytical Malvern, Reino Unido). La concentración de proteína fue de 1,0 mg/ml medida a una velocidad de escaneo de 1 °C/min con un volumen celular de 0,450 ml en regulador de histidina de 10 mM pH 6,5. Los escaneos de temperatura se realizaron de 25 a 100 °C por duplicado. Una exploración de referencia de regulador se
- 20 sustrajo de la exploración de proteína y la concentración de proteína se normalizó antes del análisis termodinámico. Los datos se graficaron y analizaron usando el software MicroCal PEAQ. La curva de DSC se ajustó usando un modelo que no era de

dos estados para obtener los valores de entalpía y temperatura(T_m) de transición aparente.

CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 (engrapado) mostró mayor estabilidad térmica con Tonset ~10 grados mayor en relación con C18B1068 (Tabla 41).

5

Tabla 41.

	C18B1068	CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4
Tonset	56,3 °C	65,8 °C
Tms (T_{m1} , T_{m2} , T_{m3})	67,9, 72,5 y 89,4 °C	72,6, y 76,9 °C

8.3.2 Estabilidad de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 bajo HCLF y condiciones de estrés

10 También se evaluó la estabilidad de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 después de la incubación de los anticuerpos bajo Formulación líquida de alta concentración (HCLF, por sus siglas en inglés) y condiciones de estrés. C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 se concentraron a ~ 150 mg/ml en 10 mM de regulador de histidina a pH 6,5 y se incubaron durante dos semanas a 40 grados Celsius. Después
15 se analizaron los anticuerpos mediante SEC analítica (aSEC, por sus siglas en inglés) y ultracentrifugación analítica (AUC, por sus siglas en inglés).

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4

20 La estabilidad de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 después de la incubación en HCLF y bajo condiciones de estrés se analizó mediante exclusión por tamaño analítica (aSEC) para monitorear agregados de proteínas, dímero, monómero y

fragmento. El análisis de aSEC se realizó usando una columna TOSOH TSKgel BioAssist G3SWxL (7,8 mm × 30 cm, 5 µm, TOSOH) en Fosfato de sodio de 0,2 M, pH 6,8 como fase móvil, y a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min en una HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). En este procedimiento descrito, se inyectaron sobre la columna un grupo de estándares de referencia con un rango de tamaño biológico de 2 a 600 kDa. Se inyectó un objetivo de 10–20 µg de proteína total por carrera. Los picos se monitorizaron usando absorbancia a 280 nm. El análisis de datos de las especies encontradas en cada muestra se realizó utilizando el software ChemStation (Agilent Technologies) (Tabla 42).

Tabla 42.

	C18B1068	CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4
% de monómero por aSEC después de la presentación a condiciones de HCLF (150-152 mg/ml, a 40 grados C durante 2 semanas)	69,3	98,8-99,7 %

Ultracentrifugación analítica

También se evaluó la estabilidad de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 mediante ultracentrifugación analítica al observar la velocidad de sedimentación del anticuerpo usando un Beckman Optima AUC. Las muestras se cargaron (450 µl) en celdas de ultracentrífuga analítica de Beckman equipadas con centros de mesa Beckman de 1,2 cm (clasificados a 50k rpm), ventanas de cuarzo y torquedadas a 130 pulg-lbs. Las células de centrífuga se colocaron en un rotor An-50 (8 ojales) y se colocaron en la cámara de la AUC. La temperatura de la AUC se equilibró a 20,5 °C durante aproximadamente 2 horas con el rotor en la cámara antes de iniciar el análisis.

Se realizaron corridas de velocidad de sedimentación a 40k rpm con 250 escaneos por anticuerpo, una frecuencia de recolección de escaneo de 90 segundo, y una resolución de datos de 10 μ M. Los datos de absorbancia se recolectaron a 280 nm. Inicialmente los datos se analizaron usando el programa de software DCDT + para determinar la

5 posición del menisco y observar los perfiles de distribución de la sedimentación.

Después se analizaron los datos usando el software de ajuste de análisis SEDFIT. La posición del menisco se estableció en el valor determinado mediante DCDT+, el valor de referencia se estableció en 7,2 cm y se eligió manualmente el rango de ajuste. Los datos se ajustaron usando el modelo de distribución c(s) continua con un rango de

10 coeficientes de sedimentación de 0-20 s, resolución de 100 y un intervalo de confianza de 0,49 para la integración de picos sin regularización. Para estimar la abundancia relativa de las diferentes especies oligoméricas, presentes en cada pico de la sedimentación de las muestras, se utilizó la función de integración.

CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 (engrapado) mostró estabilidad coloidal mejorada,

15 manteniendo > 94,4 % de monómero a 150 mg/ml después de 2 semanas de estrés térmico relativo al 69,7 % para C18B1068 (Tabla 43).

Tabla 43.

	C18B1068	CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4
% de monómero por AUC después de 2 semanas de incubación a 150 mg/ml y 40 °C	69,7 %	94,4 %

8.3.3 Estabilidad sérica de los anticuerpos CLDN18.2 x CD3 de C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4

El ensayo de estabilidad sérica se desarrolló para evaluar las propiedades de las moléculas de proteína para la unión no específica o fuera del objetivo a los componentes del suero humano. El estudio puede predecir una farmacocinética y propiedades de distribución biológica deficientes. La unión y la estabilidad de

5 C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 se evaluó tanto en regulador como en suero humano usando un método de cromatografía basado en fluorescencia. C18B1068 y CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 se etiquetaron con conjugado Alexa Fluor 488, se incubaron en regulador HBS-EP (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005 % v/v de surfactante P20, regulador 10X, GE, núm. de cat. BR100669) y suero

10 humano (((BIOIVT/Bioreclamation, núm. de cat. - HUMANSRM) en 37 °C durante 7 días y se analizaron por SEC-HPLC usando sistema de HPLC Agilent equipado con detector de fluorescencia.

100 µl de cada anticuerpo a 2,0 mg/ml en PBS se etiquetaron con kits de etiquetado de anticuerpos Alexa Fluor™, (ThermoFisher, número de catálogo: A20181)

15 de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ensayo de estabilidad en suero se configuró de la siguiente manera: para cada anticuerpo etiquetado, se prepararon muestras de 500 µl a una concentración final de proteína 300 nM en regulador 1X HBS-EP o en suero humano. Se tomaron muestras para SEC-HPLC (t₀). Las muestras se dividieron después en dos, un conjunto se almacenó a 4 °C mientras que el otro

20 conjunto se almacenó a 37 °C. Después de 7 días, las muestras evaluadas por SEC-HPLC en una columna TOSOH TSKgel BioAssist G3SWxL (7,8 mm × 30 cm, 5 µm, TOSOH) preequilibrada con una fase móvil que comprende 0,2 M de Fosfato de sodio, pH 6,8, a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min usando una HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Los picos se monitorearon usando

absorbancia a 494 nm. El análisis de datos de los picos encontrados en cada muestra se realizó usando el software ChemStation (Agilent Technologies).

CD3B1068 mostró 90 % de monómero después de 7 días de incubación a 37 °C en suero y un aumento de 9,5 % en proteínas de Alto peso molecular después de 7 días, mientras que CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4 mostró 93,7 % de monómero después de 7 días de incubación a 37 °C y un aumento de 3,3 % en proteínas de Alto peso molecular después de 7 días (Tabla 44).

Tabla 44. % de monómero, Especies de alto peso molecular (HMW S, por sus siglas en inglés) y Especies de bajo peso molecular (LMW S, por sus siglas en inglés) después de 7 días a 37 °C en suero

	C18B1068	CLDN18.2xCD3 bisp-Ab4
% de monómero	90 %	93,7 %
% de HMW S	9,5 %	5,9 %
% de LMW S	0,5 %	0,4 %