

ANTICUERPOS DE CD33, ANTICUERPOS MULTIESPECÍFICOS DE CD33/Vδ2 Y USOS DE ESTOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/608.030, presentada el 8 de diciembre de 2023, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

- 10 En la presente descripción se proporcionan anticuerpos de CD33, anticuerpos multiespecíficos de CD33/Vδ2, ácidos nucleicos y vectores de expresión que codifican los anticuerpos, las células recombinantes que contienen los vectores, y composiciones que comprenden los anticuerpos. También se proporcionan métodos para elaborar los anticuerpos, y métodos para usar los anticuerpos para tratar
- 15 enfermedades que incluyen cánceres hematológicos.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO

ELECTRÓNICAMENTE

- Esta solicitud contiene un listado de secuencias, que se presenta electrónicamente. La
- 20 información contenida en el listado de secuencias electrónico (Listado de secuencias JBI6837PCT1 Sequence Listing.xml; Tamaño: 132 KB; y fecha de creación: 5 de diciembre de 2024) se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

La inmunoterapia dirigida a dianas específicas en la leucemia mieloide aguda (AML, en inglés) plantea un obstáculo clínico significativo debido a las diversas características de las células cancerosas de AML (blastos) y la ausencia de
5 antígenos específicos de la AML. CD33 es una proteína de superficie celular que se ha detectado en blastos y células madre leucémicas de 85-90 % de pacientes que presentan AML. Curiosamente, la expresión de CD33 se restringe a células hematopoyéticas (Paul, Taylor, Stansbury, & McVicar, 2000; Ulyanova, Blasioli, Woodford-Thomas, & Thomas, 1999) pero está ausente en células madre
10 hematopoyéticas normales (Andrews, Torok-Storb, & Bernstein, 1983; Griffin, Linch, Sabbath, Larcom, & Schlossman, 1984; Jilani et al., 2002).

A pesar de las evaluaciones clínicas en curso de diversas inmunoterapias dirigidas a CD33, tal como el receptor de antígeno quimérico (CAR, en inglés)-T y las terapias con células CAR-NK, han surgido desafíos. Específicamente, las terapias que
15 involucran acopladores de células T CD3 dirigidas a CD33 han presentado problemas relacionados con la eficacia, tolerabilidad, y un perfil de seguridad indeseable. Por lo tanto, es imperativo atender las necesidades médicas no satisfechas de los pacientes con AML y MDS cuya condición no responde a la quimioterapia tradicional.

20

SUMARIO

En un aspecto general, se proporcionan en la presente descripción anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos, que se unen a CD33 de células cancerosas, en particular de células de AML o síndrome mielodisplásico (MDS, en inglés). En

ciertas modalidades, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno de estos, se unen a CD33 unido a la membrana (mCD33).

En otro aspecto general, se proporcionan en la presente descripción anticuerpos multiespecíficos, o fragmentos de unión al antígeno de estos, que se unen a CD33 de células cancerosas y a la cadena V δ 2 de un receptor de células T (TCR) expresado en una célula T V γ 9V δ 2. En ciertas modalidades, los anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos, o fragmentos de unión al antígeno de estos, se unen a mCD33. En ciertas modalidades, los anticuerpos de CD33, anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2, o fragmentos de unión al antígeno de estos, se unen al dominio C2 de CD33. En ciertas modalidades, los anticuerpos de CD33, los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2, o fragmentos de unión al antígeno de estos, se unen específicamente a CD33, preferentemente a CD33 humano. En ciertas modalidades, los anticuerpos de CD33, los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2, o fragmentos de unión al antígeno de estos, no se unen significativamente a CD33 humano soluble (sCD33).

Se proporcionan anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos, que se unen específicamente a mCD33. En ciertas modalidades, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este comprende:

- a. una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1),
una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2),
y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3)
que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:
12, 13, y 14, respectivamente; y

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16, y 17, respectivamente;

- b. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 14, respectivamente; y

una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16, y 17, respectivamente;

- c. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, 21, y 14, respectivamente; y

una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16, y 17, respectivamente; o

- d. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 22, 23, y 24, respectivamente; y

una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 25, 26, y 17, respectivamente.

- e. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 27, 28, y 29, respectivamente; y
una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31, y 32, respectivamente;
- f. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 33, 34, y 29, respectivamente; y
una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31, y 32, respectivamente;
- g. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 35, 36, y 29, respectivamente; y
una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31, y 32, respectivamente; o
- h. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 37, 38, y 39, respectivamente; y

una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 40, 41, y 32, respectivamente.

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 42 o 44, o una región variable de cadena ligera (VL), que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 43 o 45.

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una VH que comprende la sec. con núm. de ident.: 42, y una VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 43.

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una VH que comprende la sec. con núm. de ident.: 44, y una VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 45.

En ciertas modalidades, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de CD33 es una única región variable de cadena pesada (VHH).

En ciertas modalidades, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este, comprende:

- a. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente;

- b. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente;
- c. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de
5 cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente;
- d. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente;
- 10 e. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 111, respectivamente;
- f. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de
15 cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 55, 56, y 57, respectivamente;
- g. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 58, 59, y 57, respectivamente;
- h. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de
20 cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 60, 61, y 57, respectivamente; o

- i. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 62, 63, y 64, respectivamente;

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una VVH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65 o 66.

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una VHH que comprende la sec. con núm. de ident.: 65.

- 10 En algunas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una VHH que comprende la sec. con núm. de ident.: 66.

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG, preferentemente un dominio Fc de IgG1 humana.

- 15 En ciertas modalidades, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A, T366W e Y407V según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, comprende un primer dominio Fc de IgG1 humana que comprende las mutaciones

- 20 T366S, L368A e Y407V según el sistema de numeración de EU y un segundo dominio Fc de IgG1 humana que comprende la mutación T366W según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este,
5 comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende la triple mutación L234A/L235A/D265S según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende mutaciones H435R y/o Y436F según el sistema de numeración de EU.

10 En ciertas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende la triple mutación M252Y/S254T/T256E según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este es quimérico, parcialmente humanizado, o totalmente humanizado.

15 También se proporcionan en la presente descripción anticuerpos multiespecíficos de CD33/Vδ2, o fragmentos de unión al antígeno de estos.

De manera adecuada, los anticuerpos multiespecíficos de CD33/Vδ2, comprenden un anticuerpo de CD33, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a mCD33 humano, y un anticuerpo de Vδ2, o un fragmento de unión
20 al antígeno de este, que se une específicamente a la cadena Vδ2 del receptor de células T Vγ9Vδ2 humano. De manera adecuada, el anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este en el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2 es como se describe en la presente descripción para anticuerpos de CD33 o fragmentos de

unión al antígeno de estos, y el anticuerpo de Vδ2 o fragmento de unión al antígeno de este en el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2 es como se describe en la presente descripción para anticuerpos de Vδ2 o fragmentos de unión al antígeno de estos.

5 En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, comprende un anticuerpo de CD33, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera, que comprende las secuencias amino de:

- 10 a. las sec. con núms. de ident.: 12, 13, 14, 15, 16, y 17, respectivamente;
 b. las sec. con núms. de ident.: 18, 19, 14, 15, 16, y 17, respectivamente;
 c. las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 14, 15, 16, y 17, respectivamente; o
 d. las sec. con núms. de ident.: 22, 23, 24, 25, 26, y 17, respectivamente;

y un anticuerpo de Vδ2, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende

15 una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- e. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
 f. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;
 g. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o
 20 h. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, comprende un anticuerpo de CD33, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada,

una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera, que comprende las secuencias amino de:

- a. las sec. con núms. de ident.: 27, 28, 29, 30, 31, y 32, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 33, 34, 29, 30, 31, y 32, respectivamente;
- 5 c. las sec. con núms. de ident.: 35, 36, 29, 30, 31, y 32, respectivamente; o
- d. las sec. con núms. de ident.: 37, 38, 39, 40, 41, y 32, respectivamente;

y un anticuerpo de V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- 10 e. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
- f. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;
- g. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o
- h. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

En cierta modalidad, el anticuerpo multiespecífico de CD33V δ 2, comprende un anticuerpo
15 de CD33 o, un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de:

- a. las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente;
- 20 c. las sec. con núms. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente;
- d. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente; o
- e. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 111, respectivamente;

y un anticuerpo de Vδ2, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- f. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
- 5 g. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;
- h. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79 respectivamente; o
- i. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33Vδ2, comprende un anticuerpo de CD33 o, un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una

10 CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de:

- a. las sec. con núms. de ident.: 55, 56, y 57, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 58, 59, y 57, respectivamente;
- c. las sec. con núm. de ident.: 60, 61, y 57, respectivamente;
- 15 d. las sec. con núms. de ident.: 62, 63, y 64, respectivamente;

y un anticuerpo de Vδ2, o el fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- e. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
- 20 f. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;
- g. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o
- h. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 42 o 44, y una región variable de cadena ligera (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 43 o 45; y una única región variable de cadena pesada única (VHH) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, comprende:

- a. una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 42, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 43; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87; o
- b. una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 45; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, comprende una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65 o 66, y una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, comprende:

- a. una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 65; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87; o
- b. una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 66; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, comprende:

- a. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 70, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 71;
- b. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73;
- c. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68;
- d. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 75 o

- e. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 91; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 92.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 es un anticuerpo
5 biespecífico.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG, preferentemente un dominio Fc de IgG1 humana.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o un fragmento de
10 unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A, T366W e Y407V según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, comprende un primer dominio Fc de IgG1 humana que comprende la mutación triple
15 T366S/L368A/Y407V según el sistema de numeración de EU, y un segundo dominio Fc de IgG1 humana que comprende la mutación T366W según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende
20 una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o el fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende la mutación triple L234A/L235A/ D265S según el sistema de numeración de EU.

5 En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende las mutaciones H435R y/o Y436F según el sistema de numeración de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende la triple mutación M252Y/S254T/T256E según el sistema de numeración
10 de EU.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este es quimérico, parcialmente humanizado, o totalmente humanizado.

También se proporcionan uno o más polinucleótidos sintéticos que codifican los
15 anticuerpos multiespecíficos de CD33 y/o CD33/V δ 2 o fragmentos de unión al antígeno de estos, descritos en la presente descripción.

También se proporcionan uno o más vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican los anticuerpos multiespecíficos de CD33 y/o CD33/V δ 2, o fragmentos de unión al antígeno de estos, descritos en la presente descripción.

20 También se proporcionan células huésped que comprenden (i) uno o más polinucleótidos que codifican los anticuerpos multiespecíficos de CD33 y/o CD33/V δ 2, o fragmentos de unión al antígeno de estos, descritos en la presente, o (ii) el uno o más vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican los

anticuerpos multiespecíficos de CD33 y/o CD33/V δ 2, o fragmentos de unión al antígeno de estos, descritos en la presente.

En ciertas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de CD33, o el fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o el fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se proporcionan métodos para tratar el cáncer hematológico en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto las composiciones farmacéuticas de la presente descripción. En ciertas modalidades, el cáncer hematológico puede ser leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS, de bajo o alto riesgo), leucemia linfocítica aguda (ALL, que incluye todos los subtipos), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés) o neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN); En modalidades particulares, el cáncer hematológico es AML o MDS.

También se proporcionan métodos para producir el anticuerpo multiespecífico de CD33 o CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, descritos en la presente descripción. Los métodos comprenden cultivar una célula que comprende uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo multiespecífico de CD33 o CD33/V δ 2, o fragmento(s) de unión al antígeno de este, en condiciones para producir el anticuerpo multiespecífico de CD33 o CD33/V δ 2, o fragmento(s) de unión al

antígeno de este, y recuperar el anticuerpo multiespecífico de CD33 o CD33/V δ 2, o fragmento(s) de unión al antígeno de este, de la célula o cultivo.

También se proporcionan métodos para producir una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de CD33 y/o CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente, que comprende combinar el anticuerpo multiespecífico de CD33 y/o CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

La Figura 1 muestra un anticuerpo biespecífico CD33xV δ 2 (GD33B273) que se une a las células T V γ 9V δ 2. Se incubaron células T V γ 9V δ 2 aisladas y expandidas de donantes sanos con un rango de dosis del anticuerpo biespecífico CD33xV δ 2 (GD33B273) o control negativo del anticuerpo biespecífico nullxV δ 2 (GD33B73). El anticuerpo biespecífico nullxV δ 2 (GD33B73) no tiene brazo de unión a CD33. La unión se detectó por citometría de flujo. Se muestran datos de 5 donantes de células T diferentes. MFI: Intensidad de fluorescencia media.

20

Figura 2A, Figura 2B, Figura 2C, Figura 2D, y Figura 2E: Se desarrolló un ensayo LC-MS para medir la cantidad de CD33 soluble libre (sCD33) en el suero de pacientes con AML (AML1-AML30) después de la estimulación con el anticuerpo indicado. Los anticuerpos biespecíficos de CD33xV δ 2 GD33B112, GD33B116, GD33B139, y GD33B134 muestran una unión mínima a sCD33. Como referencia, los resultados de

unión de JL5 a sCD33 también se muestran usando sueros de diferentes pacientes con AML (Indiv 517-Indiv 532) (Figura 2E).

La Figura 3 muestra los resultados de un experimento que demuestra que los anticuerpos biespecíficos de CD33xV δ 2 probados (GD33B112, GD33B116, y
5 GD33B134) inducen citotoxicidad mediada por células T contra células cancerosas THP1 in vitro. Las células THP1 son una línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda. En el experimento, las células T pan (efectores) se cocultivaron con células THP1 etiquetadas con CFSE (dianas) a una
10 relación absoluta E:T de 10:1 en presencia de diversas concentraciones del anticuerpo biespecífico durante 72 horas. Los valores de citotoxicidad representados en la presente descripción se corrigieron para la citotoxicidad basal observada en ausencia del anticuerpo biespecífico. CFSE es éster succinimidilo de carboxifluoresceína, un colorante fluorescente.

La Figura 4A, la Figura 4B, la Figura 4C y la Figura 4D representan la unión celular
15 de los anticuerpos biespecíficos de CD33xV δ 2 GD33B273 (Figura 4A), GD33B112 (Figura 4B), GD33B116 (Figura 4C), y GD33B139 (Figura 4D), a células cancerosas THP1 CD33 positivas, y a líneas de células con inactivación CD33 THP1 negativas a CD33. La Figura 4E representa la unión celular del anticuerpo biespecífico de
20 CD33xV δ 2 GD33B273 a una línea celular isogénica THP1_C2 que expresa específicamente el dominio IgC2 de CD33. El dominio IgC2 de CD33 es una región conservada de la proteína receptora de superficie celular CD33.

La Figura 5A, la Figura 5B, la Figura 5C, y la Figura 5D presentan la eficacia de anticuerpos de CD33x δ 2 biespecíficos representativos, GD33B134 (Figura 5A y Figura

5B) y GD33B273 (Figura 5C y Figura 5D) en presencia de CD33 recombinante (rCD33). La presencia de rCD33 no impacta en la citotoxicidad y efectos de activación de células T de GD33B134 y GD33B273. Se añadieron concentraciones crecientes de rCD33 a los ensayos de citotoxicidad con células pan-T como células efectoras (n=3 donantes sanos diferentes) y células THP1 como células diana. La citotoxicidad y la activación de células T se evaluaron mediante citometría de flujo a las 72 horas a una relación absoluta E:T de 10:1 (relación relativa E:T ~0,13-0,4: 1, dependiente del donante). Se añadieron concentraciones crecientes de rCD33 a los ensayos de activación de células T. La activación de las células T se evaluó mediante la determinación de la expresión de CD25 en células T V δ 2.

La Figura 6 presenta la eficacia del anticuerpo biespecífico GD33B273 usando células T V δ 2+ derivadas de AML. Las células T V δ 2+ se expandieron a partir de PBMC derivadas de pacientes con AML y se probaron en un ensayo de citotoxicidad de células T con células diana GD33B273 y THP-1 en una relación E:T de 1:1. La citotoxicidad de las células THP-1 se evaluó después de 24 horas.

La Figura 7A, la Figura 7B, la Figura 7C, la Figura 7D, y la Figura 7E presentan la citotoxicidad preferencial de células cancerosas de los anticuerpos de CD33x δ 2 biespecíficos GD33B134, GD33B273, y el anticuerpo NullxV δ 2 (GD33B73), mostrando actividad contra células modelo MOLM-13 de AML (Figura 7A) y ninguna actividad contra monocitos (Figura 7B) y células inmunitarias NK (Figura 7C). Se comparó la citotoxicidad preferencial de células cancerosas entre el anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico representativo GD33B134 y el anticuerpo de CD33x δ 2 GD33B273 representativo en ensayos basados en citometría de flujo a las 96 horas con MOLM-

13 como células cancerosas diana (Figura 7A) y PBMC sanas recién aisladas de sangre completa como células efectoras (n=7 donantes sanos diferentes). La relación absoluta E:T mostrada es 20:1 (relación relativa E:T 0,16-3,6:1, dependiente del donante). Se evaluó la citotoxicidad para monocitos (Figura 7B) y células NK (Figura 5 7C) en presencia de cocultivo de células cancerosas. La activación de las células T también se analizó evaluando la expresión de CD25 en células T CD3+ totales (Figura 7D) o células T V δ 2 (Figura 7E). Los resultados muestran la activación específica de las células T V δ 2+ en comparación con las células T CD3+, las cuales no están activadas. CD, grupo de diferenciación, E:T, relación efector a diana; NK, destructor natural; PBMC, células mononucleares de sangre periférica;

La Figura 8A, Figura 8B, Figura 8C, Figura 8D muestran cómo el anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 media la citotoxicidad selectiva de las células cancerosas CD33+ (MOLM-13 y THP-1) y la activación selectiva de las células T V δ 2 en comparación con el anticuerpo que carece del brazo CD33 (NullxV δ 2, también conocido como GD33B73). Las 15 células T de donantes sanos se evaluaron en ensayos de citotoxicidad y activación de células T con anticuerpos GD33B273 y NullxV δ 2 y líneas celulares diana. Se determinó la citotoxicidad de células cancerosas para GD33B273 en ensayos basados en citometría de flujo a las 72 horas con MOLM-13 y THP-1 como células cancerosas diana (Figura 8A y 8C). El ensayo se realizó a una relación E:T relativa de 0,5:1. La activación de células T 20 se analizó evaluando la expresión de CD25 en células T V δ 2 (Figura 8B y 8D) y se midió después de 72 horas. Las Figura 8E y 8F muestran cómo el anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 media la citotoxicidad selectiva de células THP-1_C2 que expresan el dominio IgC2 de CD33 (Figura 8E) y la activación selectiva de células T V δ 2

(Figura 8F) cuando se compara con el anticuerpo que carece del brazo CD33 (NullxV δ 2, también conocido como GD33B73). Las Figura 8G y 8H muestran cómo el anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 no media la citotoxicidad selectiva de células OCI-Ly10/CD33 negativas, es decir, que no expresa CD33 (Figura 8G), y no media o muestra una activación selectiva mínima de las células T V δ 2 (Figura 8H) en comparación con el anticuerpo que carece del brazo CD33 (NullxV δ 2, también conocido como GD33B73). Las células OCI-Ly10 son una línea celular derivada del ser humano y se usan como células cancerosas diana.

Figuras 9A y 9B: el anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 no muestra toxicidades fuera del tumor en la diana. En las Figuras 9A células sanas como monocitos, células B, y células NK, cuando están en presencia del anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273, no muestran efecto de anticuerpos sobre la citotoxicidad de estas células sanas. En las Figuras 9B, la presencia del anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 da como resultado una producción de citocina nula o mínima (IFN- γ , TNF- α , IL1- β). La sangre entera de donantes sanos se probó en un ensayo de citotoxicidad de células T con GD33B273 durante 24 o 96 horas en ausencia de cocultivos de células cancerosas. Se determinó y se mostró el porcentaje de citotoxicidad de monocitos, células B y células NK (Figura 9A) y citocinas secretadas IFN- γ , TNF- α e IL1- β (Figura 9B).

La Figura 10 muestra cómo el anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 induce una potente citotoxicidad de células blásticas de médula ósea (BM, por sus siglas en inglés) de AML de 3 pacientes humanos diferentes. Las células T de donantes sanos se probaron en ensayos de citotoxicidad de células T con GD33B273 y células BM derivadas de

pacientes con AML, realizados en una relación relativa E:T de 2:1. Se evaluó la citotoxicidad del blasto CD33+ durante 24 horas. AML, leucemia mieloide aguda, BM, médula ósea, CD, grupo de diferenciación, DN, donante, E:T, efector a diana.

La Figura 11 muestra cómo el anticuerpo de CD33xδ2 biespecífico GD33B273
 5 representa un bajo riesgo de toxicidad hematopoyética mientras que muestra citotoxicidad para las células cancerosas THP-1 en una forma de respuesta a la dosis. Las HSPC CD34+ son células madre de donantes sanos, y la presencia de colonias robustas supervivientes (barras gris claro) muestra que el anticuerpo no las impacta. En
 10 contraste, las colonias de células cancerosas THP-1 (barras negras) disminuyen la supervivencia en una relación dependiente de la dosis con la concentración de anticuerpos. Se aislaron células T Vδ2+ sin exposición previa de PBMC donantes sanas y se usaron como efectores a una relación relativa E:T 1:1 con células HSPC CD34+ o células THP-1 como células diana en un ensayo de CFU. HSPC: células madre y progenitoras hematopoyéticas; CD, cúmulo de diferenciación; CFU: unidad de formación
 15 de colonias; E:T, efector a objetivo; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; La Figura 12 presenta el efecto del tratamiento con un anticuerpo de CD33xδ2 biespecífico representativo GD33B134 sobre el crecimiento de xenoinjertos MOLM-13 mezclados con células pan-T en ratones NSG. El tamaño del tumor aumenta en ausencia de anticuerpo (con solo regulador DPBS) y el tamaño del tumor disminuye
 20 en presencia del anticuerpo a diferentes dosis (1, 3, y 10 mg/kg). A los ratones NSG humanizados con células T se les inyectó SC tumores MOLM-13 mezclados con células pan-T y se les administró IP con las dosis indicadas los días 1, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 23, 27, 30 y 35 (el periodo de dosificación está indicado por la barra sólida

debajo del eje X, es decir, de 0 a 35 días). El volumen del tumor se midió dos veces por semana y los resultados se presentan como el volumen medio del tumor $\pm$ SEM para cada grupo. Los datos solo se muestran para cuando dos tercios de los animales aún estaban vivos en un grupo. DPBS, solución salina regulada con fosfato de Dulbecco; IP, intraperitoneal; NSG, diabético no obeso (NOD) inmunodeficiencia gamma combinada (scid) grave; SC, subcutáneo; SEM, error estándar de la media

La Figura 13A y la Figura 13B presentan la eficacia de un anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico representativo GD33B134 en un modelo de ratones de regresión MOLM-13 con células T V δ 2 enriquecidas como efectores. A los ratones hIL-15 NOG se les inyectó IV células MOLM-13, se humanizaron con células T V δ 2 enriquecidas (IV) el día 3 y 16, y se les administró IP con DPBS o anticuerpo a las dosis indicadas (1, 3, y 10 mg/kg) los días 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, y 28 (el periodo de dosificación está indicado por la barra sólida debajo del eje X, es decir, del día 5 al día 28 para ambas Figuras 13A y 13B). A partir del día 7 en adelante, diariamente se observaron el peso corporal y signos clínicos relacionados con la enfermedad, y los resultados se presentan como (Figura 9A) el porcentaje de supervivencia o (Figura 9B) cambio medio de peso corporal $\pm$ SEM para cada grupo. Solo se muestran datos para el periodo durante el cual dos tercios de los animales aún estaban vivos en un grupo. hIL-15, interleucina-15 humana; IP, intraperitoneal; IV, intravenoso; NOG, diabético no obeso (NOD)/inmunodeficiencia combinada (scid) grave IL2rgamma(null); SEM, error estándar de la media

La Figura 14A y la Figura 14B presentan la eficacia del anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 en un modelo de ratones de regresión MOLM-13. En esta prueba, las células cancerosas MOLM-13 fueron etiquetadas con luciferasa. Estas

células cancerosas MOLM-13 etiquetadas se implantaron el día 0 en los ratones NOG hIL-15. A los mismos ratones se les inyectó las células T el Día 3 y 16, y se les administró el anticuerpo a las dosis indicadas (0, 0,3 y 3 mg/kg) los días 4, 7, 10, 14, 17, 21 y 24 (el periodo de dosificación está indicado por la barra sólida bajo el eje X, es decir, del día 4 al día 24 para ambas Figuras 14A y 14B). Los resultados se presentan como radiancia tumoral promedio (Figura 14A) y como porcentaje de supervivencia (Figura 14B). Los datos solo se muestran para el período durante el cual dos tercios de los animales aún estaban vivos en un grupo. La Figura 14A muestra un aumento en la radiancia promedio para los ratones no tratados (0 mg/kg) en comparación con los ratones tratados con 0,3 y 3 mg/kg de anticuerpo. La Figura 14A también muestra 61 % y 54,9 % de inhibición del crecimiento tumoral en el día 17 para ratones tratados con anticuerpo a 0,3 y 3 mg/kg, respectivamente, en comparación con ratones no tratados (0 mg/kg). La Figura 14B muestra un aumento en la supervivencia de los ratones tratados con 0,3 y 3 mg/kg de anticuerpo cuando se compara con ratones no tratados (0 mg/kg). ILS, aumento de la vida útil; TGI: inhibición del crecimiento tumoral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se relaciona con anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se dirigen específicamente a CD33, una diana crítica para cánceres hematológicos. Los anticuerpos multiespecíficos o el fragmentos de unión al antígeno de estos pueden unirse adicionalmente a Vδ2.

DEFINICIONES

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

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

Para ayudar al lector de la presente solicitud, la descripción se ha separado en varios párrafos o secciones. No debe considerarse que estas separaciones desconectan la
20 sustancia de un párrafo o sección de la sustancia de otro párrafo o sección. Por el contrario, la presente abarca todas las combinaciones de las diversas secciones, párrafos y oraciones que pueden contemplarse.

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

Un “antígeno” es una estructura a la cual un anticuerpo puede unirse específica y/o
15 selectivamente. Un antígeno objetivo puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto de origen natural o sintético. En algunas modalidades, el antígeno objetivo es un polipéptido. En ciertas modalidades, un antígeno se asocia con una célula, por ejemplo, que está presente en o sobre una célula.

20 El término “identidad” se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos o dos o más moléculas de ácido nucleico, según lo determinado por alineamiento y comparación de las secuencias. El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptidos

de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software de computador disponible públicamente, tales como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN (DNAS[®]Star, Inc.). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluida cualquier los algoritmos necesarios para lograr el alineamiento máximo sobre la longitud total de las secuencias que se comparan.

El significado de “sustancialmente lo mismo” puede diferir en dependencia del contexto en el que usa el término. Debido a la probabilidad de que la variación de secuencia natural exista entre las cadenas pesada y ligera y los genes que las codifican, se podría esperar encontrar cierto nivel de variación dentro de las secuencias de aminoácidos o los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente, con poco o ningún impacto en sus propiedades de unión únicas (p. ej., especificidad y afinidad). Tal expectativa se debe en parte a la degeneración del código genético, así como además al éxito evolutivo de las variaciones de la secuencia de aminoácidos conservadora, lo que no altera de forma apreciable la naturaleza de la proteína codificada. En consecuencia, en el contexto de las secuencias de ácido nucleico, “sustancialmente

lo mismo” significa al menos 65 % de identidad entre dos o más secuencias. Preferentemente, el término se refiere a al menos 70 % de identidad entre dos o más secuencias, con mayor preferencia, al menos 75 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 80 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 85 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 90 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 91 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 92 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 93 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 94 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 95 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 96 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 97 % de identidad, con mayor preferencia, al menos 98 % de identidad y, con mayor preferencia, al menos 99 % o más de identidad.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % homología = $\text{núm. de posiciones idénticas} / \text{núm. total de posiciones} \times 100$), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Solic. Biosci 4, 11-17 (1988) que se ha incorporado en el software ALIGN (versión 2.0), que usa una tabla de peso PAM120, una penalización de longitud de interrupción de 12 y una penalización de interrupción de 4. Adicionalmente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970). El grado de variación que puede ocurrir dentro de la secuencia de aminoácido de una proteína sin tener un efecto sustancial sobre la función de la proteína es mucho más

inferior que una secuencia de ácido nucleico, ya que los mismos principios de degeneración no aplican a las secuencias de aminoácidos. En consecuencia, en el contexto de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, “sustancialmente lo mismo” significa anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos. Otras modalidades incluyen anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno específicos para CD33, que tienen marco, supercóntigo, u otras regiones no vinculantes que no comparten identidad significativa con los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción, pero no incorporan uno o más CDR u otras secuencias necesarias para conferir la unión que son 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a tales secuencias descritas en la presente descripción. Un “vector” es un replicón, tal como plásmido, fago, cósmido, o virus en el que puede insertarse operativamente otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación o la expresión del segmento.

Los términos “sujeto” y “paciente” pueden usarse indistintamente. Como se usa en la presente, en ciertas modalidades, un sujeto es un mamífero, tal como un no primate o un primate (*p. ej.*, ser humano). En modalidades específicas, el sujeto es un humano. En una modalidad, el sujeto es un mamífero, *p. ej.*, un ser humano, a quien se le ha diagnosticado una enfermedad o trastorno. En otra modalidad, el sujeto es un mamífero, *p. ej.*, un ser humano, con riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno.

“Administrar” o “administración” se refiere al acto de inyectar o, de cualquier otra manera, suministrar físicamente una sustancia, en la medida en que existe fuera del cuerpo, a un paciente, tal como mediante el suministro mucoso, intradérmico, intravenoso, intramuscular y/o cualquier otro método de suministro físico descrito en la presente o conocido en la técnica.

El término “aproximadamente” significa dentro de 20 %, dentro de 15 %, dentro de 10 %, dentro de 9 %, dentro de 8 %, dentro de 7 %, dentro de 6 %, dentro de 5 %, dentro de 4 %, dentro de 3 %, dentro de 2 %, dentro de 1 %, o menos de un valor o rango dado.

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

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

El término “entre”, como se usa en una frase tal como “entre A y B” o “entre A-B” se refiere a un rango que incluye tanto A como B.

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

siguientes modalidades: A y B y C; A y B o C; B y A o C; C y A o B; A y B; A y C; B y C; A o B o C; A o B; A o C; B o C; A (solo); B (solo); y C (solo).

CD33

- 5 El término “CD33” se refiere a una glicoproteína transmembrana de un solo paso de 67 kD (es decir, unida a la membrana), un miembro de la familia de lectinas similares a la inmunoglobulina de unión al ácido siálico (Siglecs). También reconocido como Siglec-3, gp67, o p67, CD33 comprende un dominio similar a Ig V-set amino-terminal (exón 2 de
- 10 4) en su porción extracelular (Laszlo GS et al. Expresión y caracterización funcional de variantes de transcripción CD33 en leucemia mieloide aguda humana. *Oncotarget*. 2016;7(28):43281-43294). El empalme alternativo de ARN de CD33 genera una isoforma más corta que carece de V-set pero que retiene el dominio tipo Ig C2-set (Laszlo GS, Estey EH, Walter RB. El pasado y futuro de CD33 como diana terapéutica
- 15 en la leucemia mieloide aguda. *Blood Rev*. 2014;28(4):143-153.; Laszlo et al., 2016, *ibid*). Este proceso de empalme ganó importancia con estudios recientes que destacan la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs12459419 en aproximadamente 50 % de los pacientes con AML. Este SNP conduce a la exclusión del exón 2 en CD33, dando como resultado la delección del dominio V (Lamba JK, Chauhan
- 20 L, Shin M, et al. El polimorfismo de empalme CD33 determina la respuesta a ozogamicina de gemtuzumab en leucemia mieloide aguda de novo: reporte del ensayo aleatorizado del Grupo de Oncología Infantil de fase III AAML0531. *J Clin Oncol*.

2017;35(23):2674-2682). La secuencia de referencia completa del CD33 humano está disponible en Uniprot P20138 (sec. con núm. de ident.: 88).

Sec. con núm. de ident.: 88

MPLLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPIYYDKNSPV

5 HGYWFREGAIISRDSVPATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDP SRNNCSLSIVDARRR

DNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGH SKNLTCVSW

ACEQGTPIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTE

RTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIV

KTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPT VEMDEE

10 LHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ

CD33, se considera principalmente un antígeno de diferenciación mieloide. Exhibe baja expresión en progenitores mieloides, neutrófilos, y macrófagos, sin embargo, se expresa altamente en monocitos circulantes y células dendríticas. En particular, CD33 se detecta en blastos y células madre leucémicas en 85–90 % de los pacientes con AML.

15 Notablemente, su expresión se limita a las células hematopoyéticas pero ausente en las células madre hematopoyéticas normales (Paul SP, Taylor LS, Stansbury EK, McVicar DW. El CD33 humano específico mieloide es un receptor inhibidor con función ITIM diferencial en el reclutamiento de las fosfatasas SHP-1 y SHP-2. Blood. 2000;96(2):483-

490; Ulyanova T, Blasioli J, Woodford-Thomas TA, Thomas ML. La sialoadhesina CD33

20 es un receptor inhibidor específico mieloide. Eur J Immunol. 1999;29(11):3440-3449).

Este patrón de expresión distintivo sugiere que CD33 es una diana prometedora para la terapia basada en anticuerpos en AML y MDS.

Como se señaló anteriormente, estudios recientes que destacan la presencia del SNP rs12459419 en ~50 % de los pacientes con AML revelaron su asociación con la exclusión del exón 2 en CD33, resultando en la delección del dominio V (Lamba et al., 2017 *supra*). Curiosamente, varias terapias basadas en el anticuerpo de CD33, que incluyen Mylotarg® (INN: ozogamicina de gemtuzumab) (el único anticuerpo aprobado para AML), se une y reconoce el dominio V de CD33. Este estudio indicó que Mylotarg® carece de eficacia en pacientes que expresan el SNP, siendo, por lo tanto, efectivo en solo ~50 % de la población de AML (Lamba et al., 2017 *supra*). Teniendo en cuenta los datos de Mylotarg®, es razonable esperar que otros anticuerpos de CD33 de unión a V también sean eficaces únicamente en un subconjunto de pacientes con AML, específicamente aquellos sin la mutación rs12459419 del SNP.

Los términos “proteína CD33 soluble” o “sCD33” se refieren a una forma de una proteína CD33, p. ej., una proteína CD33 humana, que no está asociada ni unida a una membrana celular. “Proteína CD33 soluble” o “sCD33” abarcan el dominio extracelular (ECD, en inglés) de las proteínas CD33 de longitud completa, y variantes de las mismas, que se desprenden de las células, es decir, no asociadas ni unidas a una membrana celular. “Proteína CD33 soluble” o “sCD33” también abarcan el ECD de cualquier fragmento de una proteína CD33, o variantes de estas, que se desprenden de las células; es decir, no asociado ni unido a una membrana celular. “Proteína CD33 soluble” o “sCD33” también abarcan el ECD de proteínas CD33 que se desprenden de las células, es decir, no asociadas o unidas a una membrana celular y que carecen de uno o más dominios, tales como un dominio transmembrana y/o un dominio citoplásmico, por ejemplo, como resultado de la proteólisis de la proteína CD33 (p. ej., en un

endosoma en una célula). En algunos casos, una “proteína CD33 soluble” o “sCD33” comprende el dominio IgV de una proteína CD33, o un fragmento de esta. En algunos casos, una “proteína CD33 soluble” o “sCD33” comprende el dominio C2 de una proteína CD33, o un fragmento de esta. En algunos casos, una “proteína CD33 soluble” o “sCD33” comprende el dominio IgV de una proteína CD33, o un fragmento de esta, y el dominio IgC2 de una proteína CD33, o un fragmento de esta. El dominio extracelular (ECD) de CD33 se desprende desde las células; por lo tanto, las muestras de pacientes normales y AML contienen una forma soluble de CD33 (es decir, sCD33). sCD33 podría competir por el anticuerpo biespecífico en la sangre e impactar su eficacia debido a los efectos de hundimiento. Los inventores han reconocido que los anticuerpos que se unen a sCD33 pueden sufrir de “efecto de hundimiento del antígeno”, por lo que el anticuerpo unido a sCD33 en la sangre se retira del sistema disminuyendo la cantidad de anticuerpo que puede alcanzar las células diana, disminuyendo su eficacia.

15 *CD33 ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE DOMINIO*

En la presente descripción se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno capaces de unirse específicamente a CD33 unido a la membrana.

El término “anticuerpo”, “inmunoglobulina” o “Ig” se usa indistintamente en la presente descripción y se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos agonistas, antagonistas, neutralizantes, anticuerpos monoclonales completos o intactos), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica o monoepitópica, anticuerpos policlonales o monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos

multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos de cadena simple y fragmentos de estos (*p. ej.*, anticuerpos de dominio), como se describe a continuación. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado, 5 quimérico y/o madurado por afinidad, así como un anticuerpo de otras especies, por ejemplo, ratón, conejo, llama, *etc.* El término “anticuerpo” pretende incluir un producto polipeptídico de células B dentro de la clase de polipéptidos de inmunoglobulina que es capaz de unirse a un antígeno molecular específico y está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en donde cada par 10 tiene una cadena pesada (aproximadamente 50-70 kDa) y una cadena ligera (aproximadamente 25 kDa), cada porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a aproximadamente 130 o más aminoácidos, y cada porción carboxiterminal de cada cadena incluye una región constante. Ver, *p. ej.*, Antibody Engineering (Borrebaeck ed., segunda ed. 1995); y 15 Kuby, Immunology (3.^a ed. 1997). Los anticuerpos también incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de manera recombinante, anticuerpos que incluyen las especies Camelidae (*p. ej.*, llama o alpaca), que incluyen VHH o nanocuerpos o sus variantes humanizados, intracuerpos, anticuerpos antiidiotipos (anti-Id), y fragmentos funcionales (*p. ej.*, fragmentos de unión al 20 antígeno) de cualquiera de los anteriores, que se refieren a una porción de un polipéptido de cadena pesada o ligera de anticuerpo que retiene algo o la totalidad de la actividad de unión del anticuerpo del cual se deriva el fragmento. Los ejemplos no limitantes de fragmentos funcionales (*p. ej.*, fragmentos de unión al antígeno)

incluyen Fv de cadena simple (scFv) (*p. ej.*, incluyen monoespecíficos, biespecíficos, etc.), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab)₂, fragmentos F(ab')₂, Fv unidos a disulfuro (dsFv), fragmentos Fd, fragmentos Fv, VHH, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, y minicuerpo. En particular, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos proporcionados en la presente pueden ser de cualquier clase (*p. ej.*, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o cualquier subclase (*p. ej.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de la molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos agonistas o anticuerpos antagonistas. Los anticuerpos pueden no ser agonistas ni antagonistas.

“Fragmento de unión al antígeno” se refiere a una porción de la proteína que se une a un antígeno. Los fragmentos de unión al antígeno pueden ser polipéptidos sintéticos, que pueden obtenerse enzimáticamente o modificarse genéticamente e incluyen porciones de una inmunoglobulina que se unen a un antígeno, tal como VH, un VL, el VH y el VL, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv, anticuerpos de dominio (dAb, por sus siglas en inglés) que consisten en un dominio de VH o un dominio de VL, dominios de VH de camélidos, dominios de VHH, unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan las CDR de un anticuerpo, tales como las porciones FR3-CDR3-FR4, la HCDR1, la HCDR2 y/o la HCDR3 y la LCDR1, la LCDR2 y/o la LCDR3, supercántigos alternativos que se unen a un antígeno y proteínas multiespecíficas que comprenden los fragmentos de unión al antígeno. Los fragmentos de unión al antígeno (tal como la VH y la VL) pueden enlazarse entre sí a través de un enlazador sintético para formar varios tipos de diseños de anticuerpos

únicos en los cuales los dominios VH/VL pueden aparearse intramolecularmente, o intermolecularmente en los casos en que los dominios de VH y VL se expresan por cadenas únicas separadas, para formar un dominio de unión al antígeno monovalente, tal como Fv de cadena simple (scFv), Fv de cadena simple engrapado (scFv), o
 5 diacuerpo. Los fragmentos de unión al antígeno también pueden conjugarse con otros anticuerpos, proteínas, fragmentos de unión al antígeno o supercóntigos alternativos que pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos para modificar proteínas biespecíficas y multiespecíficas.

Los términos “se une” o “unión” se refieren a una interacción entre moléculas que
 10 incluyen, por ejemplo, formar un complejo. Las interacciones pueden ser, por ejemplo, interacciones no covalentes que incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas y/o interacciones de Van der Waals. Un complejo puede también incluir la unión de dos o más moléculas que se mantienen unidas mediante enlaces covalentes o no covalentes, interacciones o fuerzas. La resistencia de las
 15 interacciones no covalentes totales entre un sitio de unión al antígeno único en un anticuerpo y un epítipo único de una molécula diana, tal como un antígeno, es la afinidad del anticuerpo o del fragmento funcional para ese epítipo. La relación del índice de disociación ($k_{inactiva}$) al índice de asociación (k_{activa}) de una molécula de unión (p. ej., un anticuerpo) con un antígeno monovalente ($k_{inactiva}/k_{activa}$) es la constante de
 20 disociación K_D , que está inversamente relacionada con la afinidad. Cuanto menor es el valor de K_D , mayor es la afinidad del anticuerpo. El valor de K_D varía para diferentes complejos de anticuerpo y antígeno y depende del k_{activa} y $k_{inactiva}$. La constante de disociación K_D para un anticuerpo proporcionado en la presente puede determinarse

mediante cualquier método proporcionado en la presente o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. La afinidad en un sitio de unión no siempre refleja la verdadera fuerza de la interacción entre un anticuerpo y un antígeno. Cuando los antígenos complejos que contienen múltiples determinantes antigénicos repetitivos, tales como un antígeno polivalente, entran en contacto con anticuerpos que contienen múltiples sitios de unión, la interacción del anticuerpo con el antígeno en un sitio aumentará la probabilidad de una reacción en un segundo sitio. La fuerza de tales interacciones múltiples entre un anticuerpo multivalente y el antígeno se denomina *avidez*.

En relación con los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente, los términos tales como “que se une específicamente a” y términos análogos también se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a un antígeno, tal como un polipéptido. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a, o se une específicamente a, un antígeno puede identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, Octet®, Biacore®, u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se unen a, o se unen específicamente a un antígeno cuando se une a un antígeno con mayor afinidad que a cualquier antígeno de reacción cruzada, como se determina usando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y puede ser más de 10 veces de fondo. Ver, *p. ej.*, Fundamental

Immunology 332-36 (Paul ed., segunda edición, 1989) para un debate con respecto a la especificidad de unión. En ciertas modalidades, el grado de unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a una proteína “no diana” es menor que aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno a su antígeno diana particular, por ejemplo, como se determina mediante el análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) o RIA. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a un antígeno incluye uno que es capaz de unirse al antígeno con afinidad suficiente de manera que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno sea útil, por ejemplo, como un agente terapéutico y/o diagnóstico para dirigir el antígeno. En ciertas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a un antígeno tiene una constante de disociación (K_D) menor que o igual a 1 μ M, 800 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 300 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, o 0,1 nM. En ciertas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a un epítipo de un antígeno conservado entre el antígeno de diferentes especies.

En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender porciones de un “anticuerpo completamente humano” o “anticuerpo humano”, cuyos términos se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable humana y, por ejemplo, una región constante humana. En modalidades específicas, los términos se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable y una región constante de origen humano. En ciertas modalidades, los anticuerpos “completamente humanos” pueden abarcar, además,

anticuerpos que unen polipéptidos y están codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas de origen natural de la secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana. El término “anticuerpo completamente humano” incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes

5 correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana como describen Kabat *et al.* (Ver Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación de NIH, núm. 91-3242). Esta referencia de Kabat define un esquema de numeración para las regiones variables de inmunoglobulinas (anticuerpos),

10 frecuentemente referidas como el sistema de numeración de Kabat o índice de Kabat. El sistema de numeración de EU, también llamado índice de EU, clasifica y numera los residuos de aminoácidos en dominios similar a Ig se explica en Edelman GM *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 63(1):78-85, 1969. Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácido que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser

15 humano y/o se ha elaborado mediante cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen genotecas de exhibición de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol.

20 Biol. 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)) y genotecas de exhibición de levadura (Chao *et al.*, Nature Protocols 1: 755-68 (2006)). Están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos descritos en Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol.

147(1):86-95 (1991); y van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta al desafío antigénico, pero cuyos locus endógenos han sido desactivados, *p. ej.*, ratones (*ver, p. ej.*, Jakobovits, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66 (1995); Brüggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58 (1997); y la patente de los EE. UU. núms. 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas.

En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una porción de un “anticuerpo monoclonal”, en donde el término, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *p. ej.*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores o modificaciones postraduccionales muy conocidas, tales como isomerización o desamidación de aminoácidos, oxidación de metionina o desamidación de asparagina o glutamina, cada anticuerpo monoclonal reconocerá, típicamente, un solo epítipo en el antígeno. En modalidades específicas, un “anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente, es un anticuerpo producido por un hibridoma único u otra célula. El término “monoclonal” no se limita a cualquier método particular para elaborar el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos

monoclonales útiles en la presente descripción pueden prepararse mediante la metodología de hibridoma descrita primero por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células vegetales o animales bacterianas o eucariotas (*ver, p. ej.*, patente de los EE. UU. núm. 5 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-28 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-97 (1991), por ejemplo. Otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados son, por lo tanto, muy conocidos en la técnica. Ver, p. ej., 10 Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* editores, 5.^a ed. 2002).

Una unidad de anticuerpo de 4 cadenas típica es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 dáltones. Cada cadena L se une a una cadena H mediante un enlace 15 disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tienen puentes de disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (VH) seguido por tres dominios constantes (CH) para cada una de las cadenas α e γ y cuatro dominios CH para 20 isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (VL) seguido por un dominio constante (CL) en su otro extremo. El VL está alineado con el VH, y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los

dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un VH y VL juntos forma un sitio de unión al antígeno único. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology 71 (Stites, *et al.* eds., octava edición, 1994); e Immunobiology (Janeway *et al.* Editores, 5.^a ed. 2001).

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

El término “región variable”, “dominio variable”, “región V” o “dominio V” se refiere a una porción de las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo que, generalmente, se ubica en el extremo amino-terminal de la cadena ligera o pesada y tiene una longitud de

aproximadamente 120 a 130 aminoácidos en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, y se usa en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La región variable de cadena pesada puede mencionarse como “VH”. La región variable de cadena ligera puede mencionarse como “VL”. El término “variable” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de las regiones variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos. La región V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través del tramo de 110 aminoácidos de las regiones variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos menos variables (p. ej., relativamente invariantes) llamados regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de mayor variabilidad (p. ej., variabilidad extrema) llamadas “regiones hipervariables”, que tienen cada una aproximadamente 9-12 aminoácidos de longitud. Las regiones variables de cadenas pesada y ligera comprenden cada una cuatro FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (*ver, p. ej., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (quinta edición, 1991))*). Las regiones constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas

en inglés) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés). Las regiones variables difieren extensamente en secuencias entre diferentes anticuerpos. En modalidades específicas, la región variable es una región variable humana.

El término “cadena pesada”, cuando se usa con referencia a un anticuerpo, se refiere a una cadena polipeptídica de aproximadamente 50-70 kDa, en donde la porción amino-terminal incluye una región variable de aproximadamente 120 a 130 o más aminoácidos, y una porción carboxi-terminal incluye una región constante. La región constante puede ser aquella de cinco tipos distintos (p. ej., isotipos) denominados alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ), y mu (μ), basada en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño: α , δ e γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ contienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cuando se combinan con una cadena ligera, estos distintos tipos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases bien conocidas (p. ej., isotipos) de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, que incluyen cuatro subclases de IgG, específicamente IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

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

Como se usa en la presente, los términos “región hipervariable”, “HVR”, “región determinante de complementariedad” y “CDR” se usan indistintamente. Una “CDR” se refiere a una de tres regiones hipervariables (H1, H2 o H3) dentro de la región no estructural de la estructura de hoja- β de VH de la inmunoglobulina (Ig o anticuerpo) o una de tres regiones hipervariables (L1, L2 o L3) dentro de la región no estructural de la estructura de hoja- β de VL del anticuerpo. CDR1, CDR2 y CDR3 en el dominio VH también se denominan HCDR1, HCDR2 y HCDR3, respectivamente. CDR1, CDR2 y CDR3 en el dominio V también se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3, respectivamente. En consecuencia, las CDR son secuencias de región variable intercaladas dentro de las secuencias de región estructural.

Las regiones CDR son bien conocidas por los expertos en la técnica y han sido definidas por sistemas de numeración muy conocidos. Por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de la secuencia y son las más comúnmente usadas (ver, p. ej., Kabat *et al.*, *supra*); Jia et al., J Immunol 2010; 184:5696-5704). Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (ver, p. ej., Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)). El extremo del bucle de CDR-H1 de Chothia, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si 35A y 35B están presentes, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos de AbM de Oxford

Molecular (*ver, p. ej., Antibody Engineering* Vol. 2 (Kontermann y Dübél eds., segunda ed. 2010)). Las regiones hipervariables de “contacto” están basadas en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Otro sistema de numeración universal desarrollado y adoptado ampliamente es ImMunoGeneTics (IMGT) Information System® (Lafranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77 (2003)). IMGT es un sistema integrado de información especializado en inmunoglobulinas (IG), receptores de células T (TR) y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de humanos y otros vertebrados. En la presente, se hace referencia a las CDR en términos de secuencia de aminoácidos y la ubicación dentro de la cadena ligera o pesada. Debido a que la “ubicación” de las CDR dentro de la estructura del dominio variable de la inmunoglobulina se conserva entre las especies y se encuentra presente en estructuras denominadas bucles, usando sistemas de numeración que alinean secuencias de dominio variable de acuerdo con características estructurales, los residuos de marco y CDR y se identifican fácilmente. Esta información puede usarse en el injerto y reemplazo de residuos de CDR de inmunoglobulinas de una especie en una estructura aceptora, típicamente, de un anticuerpo humano. Un sistema de numeración adicional (AHon) ha sido desarrollado por Honegger y Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309: 657-70 (2001). La correspondencia entre el sistema de numeración, que incluye, por ejemplo, la numeración de Kabat y el sistema de numeración único de IMGT, es muy conocida por un experto en la técnica (*ver, p. ej., Kabat, supra; Chothia y Lesk, supra; Martin, supra; Lefranc et al., supra*). Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables o CDR se ejemplifican en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. CDR ilustrativas de acuerdo con diversos sistemas de numeración

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

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

5 los términos “CDR” y “región determinante complementaria” de un anticuerpo determinado o región de este, tal como una región variable, así como las CDR individuales (*p. ej.*, CDR-H1, CDR-H2) del anticuerpo o región de este, debe entenderse que abarcan la región determinante complementaria como se define por cualquiera de los esquemas conocidos descritos anteriormente en la presente. En algunos casos, se especifica el

10 esquema para identificar una CDR o CDR particulares, tal como la CDR definida por el método AbM, IMGT, Kabat, Chothia, o de Contact. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR. Cabe señalar que las regiones CDR

pueden definirse además por una combinación de diversos sistemas de numeración, *p. ej.*, una combinación de sistemas de numeración de Kabat y Chothia, o una combinación de sistemas de numeración de Kabat e IMGT. Por lo tanto, el término tal como “una CDR como se expone en una VH específica” incluye cualquier CDR1 como se define por los sistemas de numeración de CDR ilustrativos descritos anteriormente, pero no se limita a estos. Una vez que se proporciona una región variable (*p. ej.*, una VH o VL), los expertos en la técnica entenderán que las CDR dentro de la región pueden definirse por diferentes sistemas de numeración o combinaciones de estos.

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

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

El término “marco” o “FR” se refiere a los residuos de la región variable que flanquean las CDR. Los residuos de FR están presentes, por ejemplo, en anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, de dominio, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos biespecíficos. Los residuos de FR son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable o residuos de CDR.

El término “dominio Fc”, en la presente descripción, se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye, por ejemplo, regiones Fc de secuencia nativa, regiones Fc recombinantes y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana se define, frecuentemente, como tramo desde un residuo de aminoácidos en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo-terminal de esta. La lisina de extremo C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Un “región Fc funcional” posee una “función efectora” de una secuencia nativa de la región Fc. La región Fc funcional se forma típicamente juntando dos dominios Fc (ya sea homodímero o heterodímero) como se describe en la presente descripción. Las “funciones efectoras” ilustrativas incluyen la unión a C1q; CDC; unión de receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación en

descenso de los receptores de superficie celular (*p. ej.*, receptor de células B), etc.

Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con una región de unión o dominio de unión (*p. ej.*, una región o dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando varios ensayos conocidos por los expertos en

5 la técnica. Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos (*p. ej.*, mediante sustitución, adición o delección). En ciertas modalidades, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región

10 Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, o de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa en la región Fc de un polipéptido parental. En la presente descripción, la región Fc variante puede tener al menos aproximadamente 80 % de homología con una

15 región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, o al menos aproximadamente 90 % de homología con esta, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 % de homología con esta.

El término “variante”, cuando se usa en relación con un antígeno o un anticuerpo, puede

referirse a un péptido o polipéptido que comprende una o más (tal como, por ejemplo,

20 aproximadamente 1 a aproximadamente 25, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 15, aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5) sustituciones, delecciones y/o adiciones de secuencias de aminoácidos en comparación con una secuencia nativa o no modificada.

Por ejemplo, una variante de un anticuerpo de CD33 puede resultar de uno o más (tal como, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 25, aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 15, aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5) cambios a una

5 secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de CD33 nativo o previamente no modificado. Las variantes pueden ocurrir naturalmente, tales como variantes alélicas o de empalme, o pueden construirse artificialmente. Las variantes de polipéptidos pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican las variantes. En modalidades específicas, la variante del anticuerpo de CD33 retiene al menos la actividad

10 funcional del anticuerpo de CD33, respectivamente. En modalidades específicas, una variante del anticuerpo de CD33 se une a CD33. En ciertas modalidades, la variante es codificada por una variante de polimorfismo de nucleótido único (SNP) de una molécula de ácido nucleótido que codifica las regiones o subregiones de VH o VL del anticuerpo anti-CD33, tal como una o más CDR.

15 El término “valente”, como se usa en la presente descripción, indica la presencia de una cantidad especificada de sitios de unión en una proteína de unión al antígeno. Un anticuerpo natural, por ejemplo, o un anticuerpo completo, tiene dos sitios de unión y es bivalente. Como tales, los términos “monovalente”, “trivalente”, “tetravalente”, “pentavalente” y “hexavalente” denotan la presencia de un sitio de unión, dos sitios

20 de unión, tres sitios de unión, cuatro sitios de unión, cinco sitios de unión, y seis sitios de unión, respectivamente, en un anticuerpo)

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para CD33 descritos incluyen todos los isotipos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y los multímeros sintéticos de la

estructura de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos incluyen, además, el isotipo IgY que se encuentra generalmente en suero de gallina o pavo y en yema de huevo de gallina y pavo.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno específicos para CD33 pueden derivarse de cualquier especie por medios recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden ser versiones quiméricas de estos en ratón, rata, carnero, caballo, cerdo, bovino, gallina, conejo, camélido, asno, o humano. Para el uso en la administración a humanos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que no se derivan de humanos pueden alterarse genética o estructuralmente para ser menos antigénicos tras la administración a un paciente humano.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son quiméricos. Como se usa en la presente, el término “quimérico” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que tiene al menos alguna porción de al menos un dominio variable derivado de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de un mamífero que no es humano, un roedor, o un reptil, mientras las porciones del anticuerpo, o del fragmento de unión al antígeno de este, se derivan de un humano.

En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden comprender porciones de formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (*p. ej.*, camélidos, murinos, primate no humano) que incluyen secuencias de inmunoglobulinas humanas (*p. ej.*, anticuerpo receptor) en el cual los residuos de CDR nativos se reemplazan por

residuos de la CDR correspondiente de una especie no humana (*p. ej.*, anticuerpo donante) tal como camélido, ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, uno o más residuos de región FR de las secuencias de inmunoglobulina humana se reemplazan por
5 residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. Una cadena pesada o ligera de anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todas al menos una o más regiones variables, en
10 las cuales todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles,
15 ver Jones *et al.*, Nature 321: 522-25 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-29 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-96 (1992); Carter, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992); las patentes de los EE. UU. núms.: 6.800.738; 6.719.971; 6.639.055; 6.407.213; y 6.054.297.

Los anticuerpos humanizados pueden ser inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de
20 inmunoglobulinas o fragmentos de estos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras secuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina que no es humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las

que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de un CDR de una especie que no es humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina que no es humana, y sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente descripción pueden presentarse en una variedad de formas, pero incluirán una o más CDR de los anticuerpos mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de regiones CDR para anticuerpos de CD33 representativos.

	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)	CDR2 (sec. con núm. de ident.:)	CDR3 (sec. con núm. de ident.:)
Nombre del anticuerpo de CD33: C33SB1SC1494			
Pesada (AbM)	GFTFDDYTMH (12)	LVSWSGGSAY (13)	ESAYNAYFDY (14)
Ligera (AbM)	KSSQSVLYSSNNKN YLA (15)	WASTRES (16)	HQFYITPYT (17)
Pesada (KABAT)	DYTMH (18)	LVSWSGGSAYYVDS VKG (19)	ESAYNAYFDY (14)
Ligera (CHOTHIA)	KSSQSVLYSSNNKN YLA (15)	WASTRES (16)	HQFYITPYT (17)
Pesada (CHOTHIA)	GFTFDDY (20)	SWSGGS (21)	ESAYNAYFDY (14)
Ligera (CHOTHIA)	KSSQSVLYSSNNKN YLA (15)	WASTRES (16)	HQFYITPYT (17)

Pesada (IMGT)	GFTFDDYT (22)	VSWSGGSA (23)	AKESAYNAYFDY (24)
Ligera (IMGT)	QSVLYSSNNKNY (25)	WAS (26)	HQFYITPYT (17)
Nombre del anticuerpo de CD33: C33F1318			
Pesada (AbM)	GFTFSRYWMS (27)	NIKRDGSEKY (28)	NSGTWEFDQ (29)
Ligera (AbM)	TRSSGSIASNDVQ (30)	EDKQRPS (31)	QSYDNNNQV (32)
Pesada (KABAT)	RYWMS (33)	NIKRDGSEKYYVDA VRG (34)	NSGTWEFDQ (29)
Ligera (KABAT)	TRSSGSIASNDVQ (30)	EDKQRPS (31)	QSYDNNNQV (32)
Pesada (CHOTHIA)	GFTFSRY (35)	KRDGSE (36)	NSGTWEFDQ (29)
Ligera (CHOTHIA)	TRSSGSIASNDVQ (30)	EDKQRPS (31)	QSYDNNNQV (32)
Pesada (IMGT)	GFTFSRYW (37)	IKRDGSEK (38)	ARNSGTWEFDQ (39)
Ligera (IMGT)	SGSIASND (40)	EDK (41)	QSYDNNNQV (32)

En la presente descripción se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a CD33 unido a la membrana. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para CD33 son IgG humana, humanizada, o derivados de esta. Cuando los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno específicos para CD33 ilustrados en la presente descripción son humanos o humanizados, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno ilustrados pueden quimerizarse.

En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo específico para CD33, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de una cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2. En algunas modalidades se presenta un anticuerpo

específico para CD33, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2 y una cadena ligera que comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en la Tabla 2.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 12, 13 y 14, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16 y 17, respectivamente. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD33 puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 42 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 43. Las CDR, el dominio variable de cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera, descritos en este párrafo son adecuados para incluir en constructos multiespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-CD33.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 14, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16 y 17, respectivamente. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD33 puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 42 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 43. Las CDR, el dominio variable de cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera, descritos en este párrafo son adecuados para incluir en constructos multiespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-CD33.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 20, 21 y 14, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera

1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende el aminoácido secuencias de las sec. con núms. de ident.: 15, 16 y 17, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno
5 puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 42 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 43. Las CDR, el dominio variable de cadena pesada, y el dominio
10 variable de cadena ligera, descritos en este párrafo son adecuados para incluir en constructos multiespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-CD33.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2
15 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 22, 23 y 24, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que
20 comprende el aminoácido secuencias de las sec. con núms. de ident.: 25, 26 y 17, respectivamente. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD33 puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un

dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 42 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 43. Las CDR, el dominio variable de cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera, descritos en este párrafo son adecuados para incluir en constructos multiespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-CD33.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3)

que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 27, 28 y 29, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31 y 32,

respectivamente. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD33 puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 44 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 45. Las CDR, el dominio variable de cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera, descritos en este párrafo son adecuados para incluir en constructos multiespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-CD33.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 33, 34 y 29, respectivamente, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de la cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31 y 32, respectivamente. Este anticuerpo o fragmento de unión al antígeno específico para CD33 puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 44 y un dominio variable de cadena ligera sustancialmente igual o idéntico a la sec. con núm. de ident.: 45. Las CDR, el dominio variable de cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera, descritos en este párrafo son adecuados para incluir en constructos multiespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-CD33.

Además se describen en la presente descripción anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a CD33 unido a membrana en donde el fragmento de unión al antígeno de este es una región variable de cadena pesada única (VHH).

“Región variable de cadena pesada única”, “VHH” o “fragmento de dAb” se refiere a un fragmento de anticuerpo compuesto por un dominio VH (Ward et al., Nature 341:544

546 (1989)). El fragmento de unión al antígeno de la presente descripción puede comprender una VHH. Las VHH son bien conocidas por el experto en la técnica, ver, p. ej., Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature* 363:446, Roovers et al. (2007) *Curr Opin Mol Ther* 9:327 y Krah et al. (2016) *Immunopharmacol Immunotoxicol* 38:21. Las VHH
5 comprenden una única CDR1 de cadena pesada, una única CDR2 de cadena pesada y una única CDR3 de cadena pesada. Las VHH pueden derivarse de cualquier especie que incluye ratón, humano, camello, llama, tiburón, cabra, conejo y vaca. Por ejemplo, moléculas de VHH que se producen de manera natural pueden derivarse de anticuerpos producidos en especies de Camelidae, por ejemplo, en camello, dromedario, llama,
10 alpaca y guanaco. Al igual que un anticuerpo completo, una VHH puede unirse selectivamente a un único antígeno específico. Las VHH pueden contener solo el dominio variable de una cadena de inmunoglobulina, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 y regiones de entramado.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que comprenden una VHH
15 descritas en la presente pueden presentarse en una variedad de formas, pero incluirán una o más CDR de los anticuerpos mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de regiones CDR para anticuerpos de CD33 representativos que comprenden una VHH.

	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)	CDR2 (sec. con núm. de ident.:)	CDR3 (sec. con núm. de ident.:)
Nombre del anticuerpo de CD33: JL45-VHH			
Pesada (AbM)	GSIFSIFDMG (46)	RITNGGITN (47)	DIAANIGSNILYDDY (48)
Pesada (KABAT)	IFDMG (49)	RITNGGITNYLDSVKG (50)	DIAANIGSNILYDDY (48)
Pesada (CHOTHIA)	GSIFSIF (51)	TNGGI (52)	DIAANIGSNILYDDY (48)
Pesada (IMGT)	GSIFSIFD (53)	ITNGGIT (54)	YADIAANIGSNILYDDY (76) o YADIAANIGSNIL (111)
Nombre del anticuerpo de CD33: AB266_1_CD33_ B12_P09.VR1			
Pesada (AbM)	GSIFSINAMG (55)	RITGGGATD (56)	DLVTRVGSDLLYDDY (57)
Pesada (KABAT)	INAMG (58)	RITGGGATDYVDSVKG (59)	DLVTRVGSDLLYDDY (57)
Pesada (CHOTHIA)	GSIFSIN (60)	TGGGA (61)	DLVTRVGSDLLYDDY (57)
Pesada (IMGT)	GSIFSINA (62)	ITGGGAT (63)	YADLVTRVGSDLLYDDY (64)

En algunas modalidades se proporciona un anticuerpo específico para CD33, o un
5 fragmento de unión al antígeno de este, que comprende una cadena pesada que
comprende una CDR1, una CDR2, y una CDR3 de una cualquiera de los anticuerpos
descritos en la Tabla 3. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y
fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de
complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de
10 complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de
complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de

aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 65. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 65. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es

al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

- 5 En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con
- 10 núms. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 65. En
- 15 algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un
- 20 brazo es un brazo anti-GITR.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena

pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 65. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 97, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 65. En

algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 55, 56, y 57, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 66. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 66. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 58, 59, y 57, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 66. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 66. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 60, 61, y 57, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras

humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 66. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 66. Las CDR y la VHH analizados en este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

- 10 En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y fragmentos de unión al antígeno comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con
- 15 núms. de ident.: 62, 63, y 64, respectivamente. Este anticuerpo específico para CD33 o fragmento de unión al antígeno puede comprender secuencias de estructuras humanas. En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 o fragmentos de unión al antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada único (VHH) sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 66. En
- 20 algunas modalidades, los anticuerpos específicos de CD33 y los fragmentos de unión al antígeno comprenden una VHH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 66. Las CDR y la VHH analizados en

este párrafo son adecuadas para incluir en constructos biespecíficos en las que un brazo es un brazo anti-GITR.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son IgG, o derivados de este, por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. En algunas
5 modalidades en donde el anticuerpo es del isotipo IgG1, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1 o dominio Fc de IgG.

En ciertas modalidades, los anticuerpos de CD33 o los fragmentos de unión al antígeno de estos se unen al dominio C2 de CD33.

En ciertas modalidades, los anticuerpos de CD33 o los fragmentos de unión al
10 antígeno de estos se unen al dominio V de CD33.

En ciertas modalidades, los anticuerpos de CD33 o los fragmento de unión al antígeno de este se unen al mCD33.

En ciertas modalidades, los anticuerpos de CD33 o los fragmentos de unión al antígeno de estos no se unen significativamente a sCD33.

15

ANTICUERPOS MULTIESPECÍFICOS DE CD33/V δ 2

Las células T son las células destructoras inmunitarias más abundantes (~75 % de linfocitos sanguíneos) y potentes. El papel de las células T efectoras en la respuesta inmunitaria contra el cáncer se apoya firmemente mediante estudios in vitro y la
20 observación de que una alta infiltración de células T CD8+ en varios tipos de cánceres se correlaciona con un pronóstico clínico favorable.

Recientemente, se realizaron importantes avances para aprovechar el potencial terapéutico de las células T para el tratamiento de cánceres. En la actualidad, se están

estudiando en ensayos clínicos dos estrategias diferentes para redireccionar las células T para lisar células cancerosas: 1) células T de donantes manipuladas genéticamente ex vivo con receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) usando fragmentos de anticuerpo que se unen a células cancerosas y 2) agentes terapéuticos proteicos biespecíficos recombinantes que consisten en un brazo que se une a CD3 en las células T, mientras que el segundo brazo se une a un antígeno asociado al cáncer. En relación con la última, las proteínas biespecíficas permiten el acoplamiento eficaz de las células T con células cancerosas. Esto provoca la estimulación del correceptor CD3 inducida por moléculas biespecíficas unidas al cáncer, lo que desencadena una activación de células T policlonales independiente de MHC y una lisis celular potente de células cancerosas. Este enfoque evita algunos de los mecanismos de tolerancia específicos del cáncer y permite que las células T reunidas destruyan las células cancerosas.

De hecho, una de las proteínas biespecíficas para CD3, blinatumomab, un acoplador biespecífico de células T (BiTE, en inglés) para CD3/CD19 ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (ALL, en inglés) B refractaria. Aunque todavía no se comprende completamente el mecanismo de acción de cómo funcionan las moléculas tipo BiTE, proporcionan evidencia de que los reactivos biespecíficos pueden inducir la formación de una sinapsis lítica artificial entre las dos células, que imita la destrucción natural mediada por lisis de células cancerosas por las células T. Los experimentos preclínicos con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) y blinatumomab han validado el concepto y proporcionado una justificación sólida para este enfoque, y ahora ensayos clínicos han proporcionado demostración del

concepto (POC, por sus siglas en inglés) en pacientes humanos. Debido al éxito clínico de este enfoque, el campo de los agentes biespecíficos dirigidos a CD3 crece rápidamente y se usa una variedad de formatos de anticuerpo para generar agentes terapéuticos para apuntar a un gran número de antígenos del cáncer. Se espera que algunos de los

5 formatos mitiguen problemas clave observados con blinatumomab, por ejemplo, el blinatumomab se depura rápidamente de la circulación y requiere una infusión i.v. continua durante el ciclo de tratamiento de 4 semanas. Se diseñan nuevos formatos para proporcionar una vida media en suero más extensa, evitando así la infusión continua.

Dado que las respuestas mediadas por células T son extremadamente potentes, pueden

10 surgir efectos secundarios graves al inducir una tormenta de citocinas o al dirigir las células T hacia los tejidos sanos que expresan niveles bajos del antígeno diana. La mayoría de las proteínas biespecíficas para CD3 actualmente en ensayos clínicos se dirigen a receptores donde la expresión se limita al linaje hematopoyético (CD19, CD20, CD123, etc.) o antígenos de cáncer altamente específicos, tales como CEA, PSMA y

15 MHCI-gp100. Por lo tanto, la aplicabilidad del redireccionamiento basado en CD3 podría limitarse a antígenos con especificidad para el cáncer o cánceres hematológicos, que impide la aplicación a muchos tipos de cánceres sólidos. Además, el redireccionamiento de células T dirigidas a CD3 con las tecnologías disponibles actualmente no ha demostrado mucha eficacia en cánceres sólidos debido a diversas razones (p. ej., la

20 inclusión de todos los tipos de células T CD3+, que incluyen células inmaduras, CD4+, Treg, pan CD8 (no CTL), células T debilitadas, etc., que podrían conducir a la eliminación ineficaz del cáncer; la activación prematura de células T que podría resultar en un índice terapéutico reducido; la activación subóptima de células T; el agotamiento o la destrucción

de las células T inducida por la activación de células T; la inducción del síndrome de liberación de citocinas que podría limitar el nivel de dosificación óptimo; la inhibición de la apoptosis de células cancerosas; menor activación de la respuesta inmunitaria adaptativa contra el cáncer; capacidad limitada de combinarse con otras inmunoterapias, etc.).

- 5 Aunque el redireccionamiento de células T a través de CD3 es atractivo, ya que produce una respuesta citotóxica policlonal que evita la respuesta de células T específica para antígeno clásica, plantea dos preocupaciones clave: 1) las células T CD3+ pueden estimularse de manera indiscriminada, incluidas varias células T inmunorreguladoras e inmunosupresoras, que se describen como desempeñando un papel activo en la evasión
- 10 inmunitaria, y 2) la activación de células T Pan que puede producir efectos secundarios graves que pueden surgir por inducir una tormenta de citocinas. Por lo tanto, el redireccionamiento a través de CD3 podría potencialmente resultar en eficacia subóptima y un índice terapéutico reducido. Para paliar algunas de las limitaciones del redireccionamiento a través de CD3, deben buscarse estrategias alternativas para
- 15 redireccionar células T hacia células cancerosas. Un enfoque sería seleccionar el redireccionamiento de solo células citotóxicas (un subconjunto) que son capaces de lisar células cancerosas en lugar de estimular y reunir de forma indiscriminada las células T pan.

Otra forma de reunir células T es apuntar a un subconjunto específico de células T.

- 20 Recientemente, las células T $\gamma\delta$ han suscitado un gran interés en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer. Estas células T poco convencionales, conocidas por su inmunidad innata, representan solo una pequeña proporción de las células T CD3+

periféricas (1 %–5 %), pero constituyen un importante subconjunto (20 %–50 %) de células T en tejidos epiteliales.

Las células T $\gamma\delta$ en la circulación expresan principalmente heterodímeros de las cadenas V γ 9 (TRGV9) y V δ 2 (TRDV2), mientras que las células T $\gamma\delta$ en el tejido
5 expresan preferencialmente cadenas V δ 1 asociadas a diferentes cadenas V γ .

En los seres humanos, las células T $\gamma\delta$ están dotadas de potentes funciones contra el cáncer (alta citotoxicidad y secreción de interferón γ). Además, las células T $\gamma\delta$ son capaces de fagocitosis, una función previamente exclusiva de las células del linaje mielóide innato, y se comportan como células presentadoras de antígeno eficaces para
10 células T $\alpha\beta$ e inducen una respuesta inmunitaria adaptativa. Se ha demostrado que las células T $\gamma\delta$ infiltran cánceres, pero la relevancia clínica de su presencia todavía se discute. Hasta ahora, todos los esfuerzos de investigación se han centrado en las células T V γ 9V δ 2, y se han destinado principalmente a activar las células T $\gamma\delta$ *in vivo* o *ex vivo* para transferencia adoptiva. Aunque los estudios clínicos todavía no son abundantes, los
15 datos preliminares señalan la importancia de tomar en cuenta al subconjunto de células T $\gamma\delta$ en la inmunoterapia a base de células T.

Por lo tanto, en ese contexto, se buscan enfoques que ayuden a superar las limitaciones de redireccionamiento basado en CD3, eviten la panactivación de células T e induzcan la lisis de cáncer potente al reunir selectivamente células T $\gamma\delta$.
20 Específicamente, las estrategias centradas en terapias con anticuerpo biespecífico con un brazo que se une a un antígeno asociado al cáncer y el otro brazo que se une $\gamma\delta$ a un receptor de célula T V δ 2 expresado por una célula T para reunir y activar $\gamma\delta$ células T, podrían abordar esta necesidad médica insatisfecha al tener un anticuerpo

biespecífico que se une a un antígeno en una célula T citotóxica auténtica y un antígeno expresado en una célula cancerosa en el tratamiento de cánceres.

Como se usa en la presente descripción, los términos “V δ 2”, “ δ 2”, o “TRDV2” se refieren a un polipéptido capaz de formar un receptor de células T junto con una cadena

5 Vy9 cuando se expresa en la superficie de $\gamma\delta$ las células T. Las células T $\gamma\delta$ que expresan δ 2 se encuentran entre las primeras células T que se desarrollan en el feto humano y son el subconjunto de células T predominante $\gamma\delta$ en las células en sangre periférica de adultos sanos. El término “ δ 2” incluye cualquier variante, isoforma, y especie homóloga de δ 2 que se expresa de forma natural por las células (que incluyen
10 las células T) o puede expresarse en células transfectadas con los genes o ADNc que codifican el polipéptido. En modalidades específicas, el δ 2 es un δ 2 humano. Una secuencia de aminoácidos δ 2 humana ilustrativa se proporciona con la entrada UniProtKB A0JD36 con número de acceso de GenBank AAB69040.1.

También se proporcionan en la presente descripción anticuerpos multiespecíficos de
15 CD33/ V δ 2 o fragmentos de unión al antígeno de estos que comprenden un anticuerpo de CD33 o un fragmento de unión al antígeno de este y un anticuerpo de V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este, se une específicamente a mCD33, y en donde el anticuerpo de V δ 2, o el fragmento de unión al antígeno de este, se une
20 específicamente a la cadena V δ 2 del receptor de células T Vy9V δ 2 humano.

Como se usa en la presente descripción, el término “anticuerpo multiespecífico” se refiere a un anticuerpo que comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en donde una primera secuencia de dominio variable de

inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una modalidad, el primer y segundo epítomos no están superpuestos o no están sustancialmente superpuestos. En una

5 modalidad, el primer y segundo epítomos están en antígenos diferentes, por ejemplo, en proteínas diferentes (o en subunidades diferentes de una proteína multimérica). En una modalidad, un anticuerpo multiespecífico comprende un tercer, cuarto o quinto dominio variable de inmunoglobulina. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico.

- 10 Como se usa en la presente descripción, el término “anticuerpo biespecífico” se refiere a un anticuerpo multiespecífico que se une a no más de dos epítomos o dos antígenos. Un anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítopo (*p. ej.*, un epítopo en un antígeno CD33) y una segunda secuencia de dominio variable de
- 15 inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo (*p. ej.*, un epítopo en un antígeno Vδ2). En una modalidad, el primer y segundo epítomos están en antígenos diferentes, por ejemplo, en proteínas diferentes (o en subunidades diferentes de una proteína multimérica). En una modalidad, un anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio
- 20 variable de cadena ligera que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una modalidad, un anticuerpo biespecífico comprende una única secuencia de dominio variable de cadena pesada que tiene especificidad de unión

para un primer epítopo y una única secuencia de dominio variable de cadena pesada que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una modalidad, un anticuerpo biespecífico comprende un medio anticuerpo, o el fragmento de este, que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y un medio anticuerpo, o el fragmento de este, que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una modalidad, un anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o el fragmento de este, que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y un scFv, o el fragmento de este, que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una modalidad, el primer epítopo se ubica en CD33 y el segundo epítopo se ubica en la cadena V δ 2 del receptor de célula T V γ 9V δ 2 humano. El anticuerpo biespecífico puede comprender un tercer, cuarto, o quinto dominio variable de inmunoglobulina que se une a uno u otro del primer y segundo epítopo (p. ej., puede tener dos dominios variables de inmunoglobulina que se unen al primer epítopo y dos dominios variables de inmunoglobulina que se unen al segundo epítopo, o puede tener dos dominios variables de inmunoglobulina que se unen al primer epítopo y un dominio variable de inmunoglobulina que se une al segundo epítopo).

En ciertas modalidades, el anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente y el anticuerpo de V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tiene cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos de (1) las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente, (2) las sec. con núms. de ident.: 80, 81, 82, respectivamente, (3) las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente, o (4) las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86, respectivamente.

Se han descrito formatos diferentes de anticuerpos multiespecíficos y se revisaron por Chames y Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de la presente descripción es un diacuerpo, un cuerpo cruzado, o un anticuerpo multiespecífico obtenido mediante
5 un intercambio de brazo Fab controlado como los descritos en la presente.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos incluyen moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; moléculas de direccionamiento doble similares a IgG recombinantes, en donde múltiples lados de la molécula contienen, cada uno, el
10 fragmento de unión o parte del fragmento de unión de al menos dos anticuerpos diferentes; moléculas de fusión a IgG, en donde los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan a un fragmento Fab extra o partes del fragmento Fab; moléculas de fusión a Fc, en donde las moléculas Fv de cadena simple o diacuerpos estabilizados se fusionan a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o
15 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 otra proteína o
20 molécula portadora.

En algunas modalidades, las moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios incluyen Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), botón-en-ojal (Genentech), CrossMAbs (Roche) y pareados electrostáticamente (Amgen), LUZ-

Y (Genentech), cuerpo de dominio manipulado de intercambio de hebras (SEEDbody)(EMD Serono), Biclonic (Merus) y DuoBody (Genmab A/S).

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 tipo IgG (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

10 En algunas modalidades, las moléculas de fusión a Fc incluyen a ScFv/Fc Fusions (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) y Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine--China).

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos de fusión a Fab incluyen 15 F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotechnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech). Los anticuerpos de dominio basados en ScFv, diacuerpos 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 20 (Academic), TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics), Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de doble direccionamiento (Ablynx), anticuerpos de dominio solo de cadena pesada de orientación doble.

Los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente se pueden generar, por ejemplo, usando el intercambio de brazos de unión (o intercambio de medias moléculas) entre anticuerpos introduciendo sustituciones en la interfaz CH3 de la cadena pesada en cada media molécula para favorecer la formación de multímeros de medias moléculas de anticuerpos que tienen una especificidad distinta, ya sea in vitro en un entorno libre de células o usando la 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 puentes 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 residuos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y simultáneamente los dominios CH3 de los anticuerpos parentales se liberan y se reforman por disociación-asociación. Los dominios CH3 de los brazos Fab pueden diseñarse 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 CD33 y un epítipo en CD3.

La “homodimerización”, como se usa en la presente, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas. Un “homodímero”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 idénticas.

La “heterodimerización”, como se usa en la presente, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 que no son

idénticas. Un “heterodímero”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 que no son idénticas.

La estrategia de “botón en ojal” (ver, p. ej., la publicación internacional núm. WO 2006/028936) puede usarse para generar anticuerpos multiespecíficos 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 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 numeración de la presente descripción es la numeración de EU.

Pueden usarse otras estrategias tales como promover la heterodimerización de cadenas pesadas mediante el uso de interacciones electrostáticas al sustituir residuos cargados positivamente en una superficie de CH3 y residuos cargados

negativamente en una segunda superficie de CH3, como se describe en la publicación de patente de los internacional núm. US2010/0015133; la publicación de patente internacional núm. US2009/0182127; la publicación de patente internacional núm. US2010/028637 o publicación de patente de los internacional núm. US2011/0123532. En otras estrategias, la heterodimerización puede promoverse por las siguientes sustituciones (expresadas como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F, o T350V_L351Y_F405A Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en la publ. internacional núm. US2012/0149876 o publ. de patente internacional núm. US2013/0195849. La numeración de la presente descripción es la numeración de EU.

Además de los métodos descritos anteriormente, los anticuerpos multiespecíficos proporcionados en la presente descripción pueden generarse in vitro en un ambiente libre de células mediante la introducción de mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de al menos dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos y la formación del anticuerpo heterodimérico triespecífico a partir de al menos dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos parentales en condiciones reductoras para permitir la isomerización de enlaces disulfuro de acuerdo con los métodos descritos en la provisional de los internacional núm. W02011/131746. En los métodos, el primer anticuerpo (p. ej., anticuerpo de CD33) y el segundo anticuerpo (p. ej., anticuerpo de

Vδ2) se diseñan para tener ciertas sustituciones en el dominio CH3 que promuevan la estabilidad del heterodímero; los anticuerpos se incuban juntos en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten isomerización de enlaces disulfuro; lo que genera así el anticuerpo biespecífico por
 5 intercambio de brazos Fab. Las condiciones de incubación pueden restablecerse de forma óptima a condiciones no reductoras. Los agentes reductores ilustrativos que pueden usarse son 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatión, tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente, un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-
 10 mercaptoetilamina, ditioneitol y tris (2-carboxietil)fosfina. Por ejemplo, puede usarse una incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-MEA o en presencia de al menos 0,5 mM de ditioneitol a un pH de 5-8, por ejemplo, a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno
 15 de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de:

- a. las sec. con núms. de ident.: 12, 13, 14, 15, 16, y 17, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 18, 19, 14, 15, 16, y 17, respectivamente;
- 20 c. las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 14, 15, 16, y 17, respectivamente;
- d. las sec. con núms. de ident.: 22, 23, 24, 25, 26, y 17, respectivamente;
- e. las sec. con núms. de ident.: 27, 28, 29, 30, 31, y 32, respectivamente;
- f. las sec. con núms. de ident.: 33, 34, 29, 30, 31, y 32, respectivamente;

g. las sec. con núms. de ident.: 35, 36, 29, 30, 31, y 32, respectivamente; o

h. las sec. con núms. de ident.: 37, 38, 39, 40, 41, y 32, respectivamente;

y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena

5 pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

a. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;

b. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;

c. las sec. con núm. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o

d. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86, respectivamente.

10 En ciertas modalidades, el anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 42 o 44 y una VL que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 43 o 45; y el anticuerpo de V δ 2 o fragmento de unión al
15 antígeno de este comprende una VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma que, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una

20 CDR3 de cadena pesada, que comprenden las secuencias de aminoácidos de:

a. las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente;

b. las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente;

c. las sec. con núm. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente;

- d. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente;
- e. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 111, respectivamente;
- f. las sec. con núms. de ident.: 55, 56, y 57, respectivamente;
- g. las sec. con núms. de ident.: 58, 59, y 57, respectivamente;
- 5 h. las sec. con núms. de ident.: 60, 61, y 57 respectivamente; o
- i. las sec. con núms. de ident.: 62, 63, y 64 respectivamente;

y el anticuerpo de Vδ2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- 10 a. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;
- c. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o
- d. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86, respectivamente.

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al
15 antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente;

y el anticuerpo de Vδ2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena
20 pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente.

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena

pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente;

y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente.

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente;

y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente.

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente;

y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86, respectivamente.

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 111, respectivamente;

- 5 y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86, respectivamente.

- En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 55, 56, y 57, respectivamente;

- y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente.

- En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 58, 59, y 57, respectivamente;

y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena

pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente.

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 60, 61, y 57, respectivamente;

y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente.

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de: las sec. con núms. de ident.: 62, 63, y 64, respectivamente;

y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de: las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86, respectivamente.

En ciertas modalidades, el anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma que, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 65 o 66; y el anticuerpo de V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VHH

que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma que, o idéntica a, la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 42, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 43; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 45; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 65; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 66; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada

que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 70, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 71.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de
5 unión al antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73

10 En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de
15 unión al antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 75.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de
20 unión al antígeno de este comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68.

En ciertas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2 o los fragmentos de unión al antígeno de estos se unen al dominio C2 de CD33.

En ciertas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2 o los fragmentos de unión al antígeno de estos se unen al dominio V de CD33.

En ciertas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2 o los fragmentos de unión al antígeno de estos se unen a mCD33.

- 5 En ciertas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2 o fragmentos de unión al antígeno de estos no se unen o no se unen sustancialmente a sCD33.

En ciertas modalidades, el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 comprende:

(A) un anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena

- 10 pesada, que comprende las secuencias amino de:

- a. las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente;
- c. las sec. con núms. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente;
- d. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente; o

- 15 e. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 111, respectivamente;

y un anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este que comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- f. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;

- 20 g. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;

- h. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79 respectivamente; o

- i. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente; y/o

- (B) una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 65 y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87; y/o
- (C) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68.

MUTACIONES, DELECCIONES O INSERCIONES

- Se pretende que las variantes de los anticuerpos de CD33 y/o los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2 estén abarcadas por la presente descripción. Las variaciones pueden ser una mutación/sustitución, delección, o inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o polipéptido, lo que resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido original. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen los CDR y los FR.
- Las mutaciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el reemplazo de una leucina con una serina, *p. ej.*, reemplazos conservadores de aminoácidos. Las técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula proporcionada en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que resulta en mutaciones de aminoácidos. Las inserciones o delecciones pueden, opcionalmente, estar en el rango de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. En ciertas modalidades, la mutación, delección,

o inserción (en conjunto modificaciones) incluye menos de 25 modificaciones de aminoácidos, menos de 20 modificaciones de aminoácidos, menos de 15 modificaciones de aminoácidos, menos de 10 modificaciones de aminoácidos, menos de 5 modificaciones de aminoácidos, menos de 4 modificaciones de aminoácidos, menos de 3 modificaciones de aminoácidos, o menos de 2 modificaciones de aminoácidos en relación con la molécula original. Por lo tanto, como se usa en la presente descripción, la referencia a “una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual que” incluye moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos (molécula original) con menos de 25 modificaciones de aminoácidos, menos de 20 modificaciones de aminoácidos, menos de 15 modificaciones de aminoácidos, menos de 10 modificaciones de aminoácidos, menos de 5 modificaciones de aminoácidos, menos de 4 modificaciones de aminoácidos, menos de 3 modificaciones de aminoácidos, o menos de 2 modificaciones de aminoácidos con respecto a la molécula original. En modalidades particulares, una molécula (p. ej., polipéptido) que tiene “una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual que” una secuencia de aminoácidos de referencia tiene 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. En una modalidad específica, la mutación/sustitución es una mutación/sustitución conservadora de aminoácidos elaborada en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales previstos. La variación permitida puede determinarse al realizar sistemáticamente inserciones, deleciones o mutaciones/sustituciones de aminoácidos en la secuencia y evaluación de las variantes resultantes para la actividad exhibida por los anticuerpos parentales.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino-y/o carboxilo-terminal que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que

contienen múltiples residuos, así como inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil que termina en N.

Los anticuerpos generados por sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen
5 en la presente descripción. En una sustitución conservadora de aminoácidos, un residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral con una carga similar. Como se describió anteriormente, se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina,
10 arginina, histidina), cadenas laterales acídicas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej.,
15 tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, las mutaciones de sustitución pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden analizarse para determinar la actividad biológica para identificar mutantes que retienen actividad. Después de la mutagénesis, puede expresarse la proteína codificada
20 y puede determinarse la actividad de la proteína. Se pueden realizar sustituciones conservadoras (p. ej., dentro de un grupo de aminoácidos con propiedades similares y/o cadenas laterales), para mantener o no cambiar significativamente las propiedades. Las mutaciones ilustrativas se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Mutaciones conservadoras de sustitución de aminoácidos

Original Residuo	Ilustrativo Mutaciones	Original Residuo	Ilustrativo Mutaciones
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met Ala; Phe
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Met (M)	Leu; Phe; Ile
Asp (D)	Glu; Asn	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Cys (C)	Ser; Ala	Pro (P)	Ala
Gln (Q)	Asn; Glu	Ser (S)	Thr
Glu (E)	Asp; Gln	Thr (T)	Val; Ser
Gly (G)	Ala	Trp (W)	Tyr; Phe
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Ile (I)	Leu; Val; Met Ala; Phe; Norleucina	Val (V)	Ile; Leu; Met Phe; Ala; Norleucina

- 5 Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (*ver, p. ej.*, Lehninger, Biochemistry 73-75 (2.^a edición, 1975)):
- (1) no polares: Ala (a), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) ácidos: Asp (D), Glu (E); y (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H). Alternativamente,
- 10 los residuos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de cadena lateral: (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y (6)

aromáticos: Trp, Tyr, Phe. Por ejemplo, cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo también puede sustituirse, por ejemplo, con otro aminoácido, tal como alanina o serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y para prevenir la reticulación anormal. Las mutaciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo progenitor (*p. ej.*, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para estudios adicionales tendrá(n) modificaciones (*p. ej.*, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (*p. ej.*, mayor afinidad, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo progenitor y/o retendrá sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo progenitor. Una variante sustitutiva ilustrativa es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente, *p. ej.*, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en exhibición de fagos tales como las descritas en la presente descripción. Brevemente, uno o más residuos de CDR se mutan y los anticuerpos variantes se exhiben en fago y se analizan para determinar una actividad biológica particular (*p. ej.*, afinidad de unión).

Pueden hacerse alteraciones (*p. ej.*, mutaciones) en CDR, *p. ej.*, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones pueden hacerse en “puntos críticos” de CDR, es decir, residuos codificados por codones que experimentan mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (*ver, p. ej.*, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), con el anticuerpo variante resultante o

fragmento de este que se prueba para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración por afinidad mediante la construcción y reelección a partir de genotecas secundarias, *p. ej.*, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas modalidades de maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para maduración por cualquiera de una variedad de métodos (*p. ej.*, PCR propensa a errores, reordenamiento de cadenas, o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Después, se crea una genoteca secundaria. La genoteca se analiza después para identificar cualesquier variantes de anticuerpos con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos por CDR, en los cuales se aleatorizan varios residuos de CDR (*p. ej.*, 4-6 residuos por vez). Los residuos de CDR involucrados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, *p. ej.*, usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. En la sección a continuación se proporciona una descripción más detallada con respecto a la maduración por afinidad.

En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ocurrir dentro de una o más CDR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservadoras (*p. ej.*, sustituciones conservadoras como se proporcionan en la presente descripción) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden realizarse en las CDR. En algunas modalidades de las secuencias de anticuerpos variantes proporcionadas en la presente descripción, cada CDR no se altera, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser objeto de mutagénesis se denomina “mutagénesis de exploración de alanina”, como se describe en Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). En este método, un residuo o grupo de residuos diana (p. ej., residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) se identifican y reemplazan por un aminoácido cargado neutral o negativamente (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción del anticuerpo con el antígeno. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativa o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos pueden dirigirse o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden analizarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino- y/o carboxilo-terminal que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen múltiples residuos, así como inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil que termina en N. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media sérica del anticuerpo.

Las variaciones pueden realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis (dirigida al sitio) mediada por oligonucleótidos, exploración con alanina y mutagénesis por PCR. Mutagénesis dirigida al sitio (*ver, p. ej., Carter,*

Biochem J. 237: 1-7 (1986); y Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10: 6487-500 (1982)), mutagénesis por inserción de un casete (*ver, p. ej.*, Wells *et al.*, Gene 34: 315-23 (1985)), u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN de la variante del anticuerpo.

- 5 En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o el fragmento de unión al antígeno de este, es una IgG. En algunas modalidades, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, es un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, es un isotipo
10 IgG1, o comprende un dominio Fc de IgG1 humana.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende la sustitución de perilla en agujero (KiH) en el dominio Fc de IgG1 humana. Un dominio Fc de IgG1 humana comprende una sustitución T366W (el dominio Fc “botón”), mientras que el
15 otro dominio Fc de IgG1 humana comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A, e Y407V según la numeración de EU (el dominio Fc “ojal”). De manera adecuada, un dominio Fc de IgG1 humana comprende una sustitución T366W (el dominio Fc “botón”), mientras que el otro dominio Fc de IgG1 humana comprende la mutación triple T366S/L368A/Y407V por la numeración de EU (el
20 dominio Fc “ojal”).

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A y D265S, según la numeración de EU, en el dominio Fc

de IgG1 humana. De manera adecuada, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende la mutación triple L234A/L235A/D265S en el dominio Fc o región Fc. En algunas modalidades, se sabe que estas mutaciones, conocidas como mutaciones de AAS, en el dominio Fc de IgG1 humana limitan o suprimen las interacciones de anticuerpos con los receptores Fc.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende mutaciones H435R y/o Y436F en el dominio Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, se sabe que estas sustituciones en la región Fc interrumpen la unión de la proteína A a dominios Fc de IgG1 humana monoméricos y homodimerizados de “ojales”.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende la triple mutación M252Y/S254T/T256E en el dominio Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, se ha demostrado que estas mutaciones, conocidas como mutaciones YTE, en el dominio Fc de IgG1 humana aumentan la vida media sérica de los anticuerpos en comparación con las versiones de tipo silvestre de este anticuerpo.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A y D265S, según la numeración de EU, en el dominio Fc de IgG1 humana.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende la sustitución

H435R e Y436F, según la numeración de EU, en al menos un dominio Fc. En alguna modalidad, estas mutaciones, conocidas como mutaciones de RF, facilitan la purificación de la molécula multiespecífica deseada.

Se sabe que los aminoácidos 435R y 436F que se encuentran en los dominios CH3
5 de IgG3 evitan la unión a la resina de proteína A (Jedberg et al. J Immunol Methods. 201(1):25-34, 1997). Por lo tanto, al incorporar las sustituciones H435R e Y436F en solo una de las cadenas pesadas de una molécula heterodimérica (p. ej., creando sustituciones en Fcs de IgG1 que equivalen a los aminoácidos 435R y 436F que se encuentran en IgG3) significa que se producen tres especies después de la expresión,
10 dos homodímeros y un heterodímero. Desde un punto de vista estadístico, 25 % de los productos expresados portarán la doble mutación en ambas cadenas pesadas y no interactuarán con la columna de Proteína-A durante la purificación. En consecuencia, este producto secundario no deseado se puede encontrar en el flujo de paso. Otra especie con aproximadamente 25 % del producto de expresión total no lleva
15 mutaciones en sus cadenas pesadas y, por lo tanto, se unirá fuertemente a la Proteína-A. Siendo la especie principal aproximadamente 50 % es la biespecífica deseada que comprende la doble mutación RF en una sola cadena, que muestra afinidad media a la resina.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de
20 CD33/Vδ2, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende las mutaciones de botón y ojal, las mutaciones AAS y las mutaciones YTE. En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2, o fragmento

de unión al antígeno de este, comprende además la mutación RF en al menos un dominio Fc.

MÉTODOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE sCD33

- 5 Se puede usar cualquier método adecuado conocido en la técnica para determinar los niveles de sCD33 en una muestra. Por ejemplo, los niveles de sCD33 en una muestra (p. ej., una muestra de líquido cefalorraquídeo, o una muestra de sangre tal como una muestra de sangre completa, suero o plasma) pueden determinarse usando inmunoblot (p. ej., transferencia Western), espectrometría de masas,
- 10 citometría de flujo, un inmunoensayo (p. ej., un ensayo SIMOA de Quanterix, ver, p. ej., el sitio web: www.quanterix.com/simoa-technology/), un ensayo de extensión de proximidad (p. ej., un ensayo de Olink, ver, p. ej. el sitio web: www.olink.com/our-platform/our-pea-technology), un ensayo basado en electroquimioluminescencia (p. ej., un ensayo de Meso Scale Diagnostics, ver, p. ej., el sitio web: www.mesoscale.com/es/technical_resources/our_technology/ecl), y/o métodos
- 15 basados en aptámeros como el ensayo SOMASCAN (ver. p. ej., Candia et al. (2017) Sci Rep 7, 14248).

En algunas modalidades, los niveles de sCD33 en una muestra (p. ej., una muestra de líquido cefalorraquídeo, o una muestra de sangre tal como una muestra de sangre

- 20 completa, suero o plasma) se determinan usando un método basado en espectrometría de masas. Por ejemplo, los niveles de sCD33 en una muestra (p. ej., una muestra de líquido cefalorraquídeo, o una muestra de sangre tal como una muestra de sangre completa, suero o plasma) pueden determinarse usando un ensayo de cromatografía

líquida cuantitativa de monitoreo de reacciones múltiples espectrometría de masas (LCMRM/MS). La determinación de los niveles de sCD33 usando un ensayo de Espectrometría de masas de monitorización de reacciones múltiples por cromatografía líquida cuantitativa (LCMRM/MS) puede comprender una o más, o todas, de las siguientes

5 etapas, como se describe en el Ejemplo 5 en la presente descripción: (a) preparación de estándares de calibración (p. ej., estándares de calibración pueden prepararse a niveles, p. ej., ocho niveles, que cubren el intervalo de ensayo mediante picos [es decir, añadir] proteína CD33, por ejemplo, proteína CD33 recombinante, en matriz sustituta, p. ej., matriz sustituta para la muestra tratada con el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo

10 multiespecífico de CD33/V δ 2[p. ej., una matriz sustituta para líquido cefalorraquídeo, sangre completa, suero o, como una solución reguladora adecuada]); (b) preparación de muestras de control de calidad (QC) (p. ej., las muestras de QC pueden prepararse a niveles, p. ej., tres niveles, que cubren el rango de ensayo estimulando la proteína CD33, p. ej., proteína CD33 recombinante, en muestras agrupadas de individuos de referencia

15 [p. ej., en muestras agrupadas de líquido cefalorraquídeo, sangre completa, suero o plasma de individuos sanos]), y/o muestras de QC a niveles endógenos (muestras de QC no estimulada, p. ej., se pueden preparar muestras de QC no estimuladas a partir de muestras agrupadas de individuos de referencia [p. ej., muestras agrupadas de líquido cefalorraquídeo, sangre completa, suero o plasma de individuos sanos] no estimuladas

20 con proteína CD33), y/o muestras en blanco; (c) proporcionar muestras de una o más personas tratadas con anticuerpo anti-CD33, p. ej., muestras de líquido cefalorraquídeo o muestras de sangre como muestras de sangre entera, suero o plasma; (d) digerir, p. ej., con tripsina u otra enzima adecuada, los estándares de calibración, muestras de QC,

muestras de QC no estimuladas, muestras en blanco, y/o muestras de una o más personas tratadas con anticuerpo anti-CD33; (e) aumentar (es decir, añadir a) los estándares de calibración, muestras de control de calidad, muestras de QC no estimuladas, muestras en blanco, y/o muestras de uno o más individuos tratados con anticuerpo anti-CD33 un péptido estándar interno etiquetado con isótopo estable (SIL) para sCD33; (f) desalar los estándares de calibración, muestras de QC, muestras de QC no estimuladas, muestras en blanco y/o muestras de una o más personas tratadas con anticuerpo anti-CD33 usando una matriz sorbente de extracción en fase sólida (SPE); (g) analizar los estándares de calibración, muestras de QC, muestras de QC no estimuladas, muestras en blanco, y/o muestras tratadas con el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/Vδ2 usando un ensayo LC-MRM/MS, en donde se monitorean las transiciones del péptido diana endógeno y su contraparte SIL; (h) determinar la concentración de sCD33 en las muestras tratadas con el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/ Vδ2 calculando la proporción de péptido diana endógeno y péptido SIL y calculando de nuevo el valor en una curva de calibración.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/ Vδ2 o el fragmento de unión a antígeno de este, no se une a sCD33 (o a su sustituto, rCD33). Como se describe en la presente descripción, el significado de la expresión “no se une a sCD33” abarca la ausencia de unión significativa a sCD33 (o a su sustituto, rCD33). La ausencia de unión significativa a sCD33, (p. ej., “no se une significativamente a sCD33” como se usa en la presente descripción) se entiende de acuerdo con su significado ordinario en el campo, y puede evaluarse por cualquier medio, que el experto en la técnica considere apropiado.

Por ejemplo, la sCD33 como una forma libre en suero humano no disminuye significativamente, o no disminuye en más de 50 % (p. ej., no disminuye en más de 40 %) [o disminuye en menos de 50 % (p. ej., disminuye en menos de 40 %)] una vez que se pone en contacto con 0,2 nM del anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este.

Por ejemplo, cuando se pone en contacto con una muestra biológica que contiene sCD33 (tal como una muestra de suero de un paciente humano con AML), o en una muestra biológica, que se ha aumentado con 10 ng/ml de rCD33, el anticuerpo y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígenos de este (p. ej., a una concentración de 0,2 nM) no disminuye significativamente el nivel de forma libre de sCD33, o al menos no lo disminuye en más de 50 % (p. ej., no lo disminuye en más de 40 %)

Por ejemplo, el valor de EC50 de citotoxicidad de células T del anticuerpo y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este en células tumorales tales como la línea celular THP-1 no se ve afectado significativamente por la presencia de 10 ng/ml de rCD33 (es decir, el mismo o sustancialmente el mismo valor de EC50 en ausencia o en presencia de 10 ng/ml de rCD33; cf. ensayo de citotoxicidad de células T del ejemplo 9).

Por ejemplo, el anticuerpo de CD33 y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este tienen una afinidad por sCD33 o rCD33 menor que un anticuerpo que no es específico de mCD33 (es decir, que se une a sCD33 o rCD33).

En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33 y/o anticuerpo y/o el anticuerpo multiespecífico de CD33/ V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este, tiene mayor afinidad por la unión a mCD33 que sCD33.

5 ANTICUERPOS HUMANIZADOS

El anticuerpo de CD33 y/o los anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2 descritos en la presente incluyen anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados, tales como los anticuerpos humanizados descritos en la presente descripción, pueden producirse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el injerto de CDR (patente europea núm. EP 239.400; publicación internacional núm. WO 91/09967; y las patentes de los EE. UU. núms. 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), enchapado o acondicionamiento (patentes europeas núms. EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); y Roguska *et al.*, *PNAS* 91:969-973 (1994)), la combinación de cadenas (patente de los EE. UU. núm. 5.565.332) y las técnicas descritas en, *p. ej.*, la patente de los EE. UU. núm. 6.407.213, la patente núm. 5.766.886, WO 9317105; Tan *et al.*, *J. Immunol.* 169:1119-25 (2002), Caldas *et al.*, *Protein Eng.* 13(5):353-60 (2000), Morea *et al.*, *Methods* 20(3):267-79 (2000), Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84 (1997), Roguska *et al.*, *Protein Eng.* 9(10):895-904 (1996), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene* 150(2):409-10 (1994), y Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73 (1994). Ver también la publicación de patente de los EE. UU. núm.

US 2005/0042664 A1 (24 de febrero de 2005), cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, los anticuerpos proporcionados en la presente descripción pueden ser anticuerpos humanizados que se unen a CD33 o CD33 y V δ 2, que
5 incluyen CD33 humana y V δ 2 humano. Diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humano. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan, frecuentemente, como residuos de “importación”, que se toman,
10 típicamente, de un dominio variable de “importación”. La humanización puede realizarse, por ejemplo, siguiendo el método de Jones *et al.*, Nature 321:522-25 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-27 (1988); y Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534-36 (1988)), al sustituir secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano.

15 En algunos casos, los anticuerpos humanizados se construyen mediante injerto de CDR, en el que las secuencias de aminoácidos de las CDR del anticuerpo no humano parental se injertan en un marco de anticuerpo humano. Por ejemplo, Padlan *et al.* determinaron que solo aproximadamente un tercio de los residuos en las CDR entran realmente en contacto con el antígeno, y los denominaron “residuos determinantes de
20 especificidad” o SDR, por sus siglas en inglés (Padlan *et al.*, FASEB J. 9:133-39 (1995)). En la técnica de injerto de SDR, solo los residuos SDR se injertan en el marco de anticuerpo humano (ver, p. ej., Kashmiri *et al.*, Methods 36:25-34 (2005)).

La elección de los dominios variables humanos que se usarán para preparar los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Por ejemplo, de acuerdo con el método denominado “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo no humano se analiza frente a la genoteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más cercana a la del anticuerpo no humano puede seleccionarse como el marco humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296-308 (1993); y Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992); y Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623-32 (1993)). En algunos casos, el marco se deriva de las secuencias de consenso de las subclases humanas más abundantes, el subgrupo I (VL6I) de VL6 y el subgrupo III (VHIII) de VH. En otro método, los genes de la línea germinal humana se usan como fuente de las regiones marco.

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

como donantes de FR. Finalmente, las CDR no humanas se injertan en estos FR (ver, p. ej., Tan et al., J. Immunol. 169:1119-25 (2002)).

Además, es generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con la retención de su afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar

5 este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se encuentran disponibles comúnmente y resultan familiares para los expertos en la

10 técnica. Los programas de computación que ilustran y muestran las estructuras de conformación tridimensional probables de las secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidato se encuentran disponibles. Estos incluyen, por ejemplo, WAM (Whitelegg and Rees, Protein Eng. 13: 819-24 (2002)), Modeller (Sali and Blundell, J. Mol. Biol. 234: 779-815) y Swiss PDB Viewer (Guex and Peitsch, Electrophoresis 18:

15 2714-23 (1997)). La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de consenso e importación de

20 manera que se alcancen las características deseadas del anticuerpo, tal como, afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana(s). Generalmente, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.

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

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

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

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

En el barajado de FR, las FR en su totalidad se combinan con las CDR no humanas en lugar de crear genotecas combinatorias de variantes de residuos seleccionados (ver, p. ej., Dall'Acqua *et al.*, Methods 36:43-60 (2005)). Puede usarse un proceso de barajado de FR de una etapa. Tal proceso ha demostrado ser eficiente, ya que los anticuerpos resultantes exhibieron propiedades bioquímicas y fisicoquímicas mejoradas que incluyen expresión mejorada, afinidad aumentada, y estabilidad térmica (ver, p. ej., Damschroder *et al.*, Mol. Immunol. 44:3049-60 (2007)).

- 10 El método “humanización” se basa en la identificación experimental de determinantes de especificidad mínimos esenciales (MSD) y se basa en el reemplazo secuencial de fragmentos no humanos en genotecas de FR humanas y evaluación de unión. Esta metodología típicamente da como resultado la retención de epítopos e identificación de anticuerpos de subclases múltiples con distintas CDR del
15 segmento V humano.

El método de “ingeniería genética humana” implica alterar un anticuerpo no humano o fragmento de anticuerpo al hacer cambios específicos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para producir un anticuerpo modificado con inmunogenicidad reducida en un ser humano que no obstante retiene las propiedades de unión deseables de los
20 anticuerpos no humanos originales. Generalmente, la técnica implica clasificar los residuos de aminoácidos de un anticuerpo no humano como residuos de “bajo riesgo,” “riesgo moderado,” o “alto riesgo”. La clasificación se realiza usando un cálculo global de riesgo/recompensa que evalúa los beneficios esperados de la realización de una

sustitución particular (*p. ej.*, para inmunogenicidad en seres humanos) contra el riesgo de que la sustitución afecte el plegado del anticuerpo resultante. El residuo de aminoácido humano particular que se sustituirá en una posición determinada (*p. ej.*, un riesgo bajo o moderado) de una secuencia de anticuerpos no humanos se puede seleccionar alineando una secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo no humano con la región correspondiente de una secuencia de anticuerpo humano específica o de consenso. Los residuos de aminoácidos en posiciones de riesgo bajo o moderado en la secuencia no humana pueden sustituirse por los residuos correspondientes en la secuencia del anticuerpo humano de acuerdo con el alineamiento. Las técnicas para elaborar proteínas de ingeniería humana se describen con mayor detalle en Studnicka et al., *Protein Engineering* 7:805-14 (1994); las patentes de los EE. UU. núms. 5.766.886; 5.770.196; 5.821.123; y 5.869.619; y la publicación PCT núm. WO 93/11794.

Un anticuerpo humano compuesto puede generarse mediante, por ejemplo, la tecnología Composite Human Antibody™ (Antitope Ltd., Cambridge, United Kingdom). Para generar anticuerpos humanos compuestos, las secuencias de región variable se diseñan a partir de fragmentos de múltiples secuencias de región variable de anticuerpo humano de una manera que evita los epítomos de células T, lo que minimiza por lo tanto la inmunogenicidad del anticuerpo resultante.

Un anticuerpo desinmunizado es un anticuerpo en el cual se han eliminado los epítomos de células T. Se han descrito métodos para elaborar anticuerpos desinmunizados. Ver, *p. ej.*, Jones *et al.*, *Methods Mol Biol.* 525:405-23 (2009), xiv, y De Groot *et al.*, *Cell. Immunol.* 244:148-153(2006)). Los anticuerpos desinmunizados comprenden regiones variables agotadas de epítomos de células T y regiones constantes humanas.

Brevemente, las regiones variables de un anticuerpo se clonan y los epítomos de células T se identifican, posteriormente, mediante pruebas de péptidos superpuestos derivados de las regiones variables del anticuerpo en un ensayo de proliferación de células T. Los epítomos de células T se identifican por medio de métodos *in silico* para identificar la unión peptídica al MHC clase II humano. Se introducen mutaciones en las regiones variables para anular la unión al MHC clase II humano. Las regiones variables mutadas se usan, después, para generar el anticuerpo desinmunizado.

POLINUCLEÓTIDOS, VECTORES Y CÉLULAS HUÉSPED

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con polinucleótidos sintéticos que codifican un anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente. En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con uno o más ácidos nucleicos aislados que codifica un anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este, o un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, tal como se usa indistintamente en la presente, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante la polimerasa de ADN o ARN o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, una “secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones redundantes entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La secuencia de polinucleótidos de frase que codifica una proteína o un

5 ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína pueda contener en alguna versión uno(s) intrón(es).

Los expertos en la técnica apreciarán que la secuencia codificante de una proteína puede cambiarse (p. ej., reemplazarse, eliminarse, insertarse, etc.) sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. En consecuencia, los expertos en la técnica entenderán que

10 los polinucleótidos sintéticos que codifican los anticuerpos de CD33 y/o anticuerpos multiespecíficos de CD33/Vδ2 de la descripción pueden alterarse sin cambiar las secuencias de aminoácidos de las proteínas.

En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada anti-CD33 de GD33B273 comprende:

15 Sec. con núm. de ident.: 89:

CAAGTGCAACTTGTGGAAAGTGGTGGCGGACTTGTGCAAGCTGGTGGCTCATT
 GAGGCTGTCTTGTGAAGCATCTGGCTCAATCTTCAGCATCTTTGATATGGGTTG
 GTATAGAAGACCTCCCGGGGCTCAGAGAGAACTGGTGGCTAGAATCACAAATG
 GTGGGATTACCAATTACCTCGATTCAGTTAAGGGAAGGTTCTCTATTTCCAGAG
 20 ACAATGCCAAGAATACTGTGTACTTGCAAATGAACAGCTTGAATGCCGAAGATA
 CAGCCGTGTACTATTGTTACGCAGATATTGCAGCAAACATTGGCTCAAACATTC
 TGTACGATGACTATTGGGGTCAAGGAACACAAGTTACAGTCAGTTCTGAGCCCA
 AATCTAGCGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCC

GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCTACAT
CACCCGGGAGCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
5 CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG
ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC
10 CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCGGTTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGG
AAAA

En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena pesada anti-V δ 2 de GD33B273 comprende:

Sec. con núm. de ident.: 90:

GAAGTTCAGCTGGTTGAAAGTGGTGGTGGCCTTGTGCAAGCCGGTGGCTCATTA
CGCTTGTCATGTGCAGCCTCTGGAAGACCTTTCAGCAATTATGGGATGGGGTGG
TTTAGACAAGCACCCGGAAAGAAACGCGAGTTTGTGCTGGCATTTCATGGAGT
20 GGCGGAAGTACAGATTATGCAGATTCTGTAAAGGACGCTTTACAATTAGTCGG
GACAACGCAAAGAATACCGTGTATCTCCAGATGAATAGCCTTAAGCCAGAAGAT
ACAGCCGTTTATTATTGTGCCGCTGTTTTCTCTGGTGCTGAAACTGCATACTATC
CATCAGACGACTACGATTATTGGGGTCAAGGAACTCAAGTGACAGTTTCTAGTGA

GCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC
 CGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCTA
 CATCACCCGGGAGCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG
 ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 5 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
 TGTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
 10 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
 GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con uno o más vectores
 15 que comprenden una o más secuencias polinucleotídicas sintéticas que codifican un
 anticuerpo de CD33, o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la
 presente. En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con uno o
 más vectores que comprenden una o más secuencias polinucleotídicas sintéticas que
 codifican un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o fragmento de unión al
 20 antígeno de este, descrito en la presente descripción. El término “vector” se refiere
 a una sustancia que se usa para transportar o incluir una secuencia polinucleotídica,
 que incluye, por ejemplo, una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo
 o fragmento de unión al antígeno como se describe en la presente descripción, para

introducir una secuencia polinucleotídica en una célula huésped. Los vectores aplicables para usarse incluyen, por ejemplo, vectores de expresión, plásmidos, vectores de fagos, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, que pueden incluir secuencias de selección o marcadores operables para una integración estable

5 en un cromosoma de la célula huésped. Adicionalmente, los vectores pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de expresión apropiadas. Los genes marcadores seleccionables que pueden incluirse, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos que no están en los medios

10 de cultivo. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de transcripción, terminadores de transcripción y lo similar, que son muy conocidos en la técnica. Cuando dos o más moléculas polinucleotídicas se coexpresarán (*p. ej.*, tanto una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo como un VH y VL del anticuerpo), ambas moléculas

15 polinucleotídicas pueden insertarse, por ejemplo, en un vector de expresión único o en vectores de expresión separados. Para el vector de expresión único, los polinucleótidos codificantes puedan estar operativamente unidos a una secuencia de control de expresión común o ligados a diferentes secuencias de control de expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La

20 introducción de las moléculas de polinucleótido en una célula huésped puede confirmarse mediante métodos muy conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, el análisis de ácido nucleico tal como la membrana de Northern o la ampliación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ARNm,

inmunotransferencia para la expresión de productos génicos u otros métodos analíticos adecuados para probar la expresión de una secuencia de polinucleótidos introducida o su correspondiente producto génico. Un experto en la técnica entenderá que las moléculas de ácido nucleico se expresan en una cantidad suficiente para producir un producto deseado, y se entiende, además, que los niveles de expresión pueden optimizarse para obtener suficiente expresión mediante métodos muy conocidos en la técnica.

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con una célula huésped que comprende un polinucleótido sintético que codifica un anticuerpo de CD33 y/o un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o un fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente. El término “célula huésped”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula de un sujeto particular que puede transfectarse con una molécula de polinucleótido y la progenie o progenie potencial de una célula. La progenie de tal célula puede no ser idéntica a la célula original transfectada con la molécula de polinucleótido debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden ocurrir en generaciones posteriores o la integración de la molécula de polinucleótido en el genoma de la célula huésped.

El término “transfectado” o “transformado” o “transducido”, como se usa en la presente, se refiere a un proceso por el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula huésped. Una célula “transfectada” o “transformada” o “transducida” es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

Cualquier célula huésped conocida por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción puede usarse para la expresión recombinante de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente. Las células de mamíferos, hongos, bacterias o plantas son particularmente adecuadas. Las células de mamíferos, que incluye humanos, monos, ratas, ratones, conejillos de indias se usan de forma rutinaria y son adecuadas. Además podrían usarse células fúngicas que incluye levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), *Pichia pastoris*, *Neurospora crassa*. Además se pueden usar bacterias, tal como *E. coli*. Sin embargo, las líneas celulares de mamíferos, tales como CHO, HEK y NS0 son el sistema de expresión preferido y más comúnmente usado para la producción de anticuerpos recombinantes (p. ej., para uso clínico) y se expresan más convenientemente a menudo porque permiten fácilmente modificaciones postraduccionales y pueden producir anticuerpos con patrones de glicosilación similares a los humanos. En algunas modalidades, las células huésped son células de *E. coli* TG1 o BL21 (para la expresión de, p. ej., un anticuerpo scFv o Fab), células CHO-DG44 o CHO-K1 o células HEK293 o NS0 (para la expresión de, p. ej., un anticuerpo IgG de longitud total). De acuerdo con modalidades particulares, el vector de expresión recombinante se transforma en células huésped por métodos convencionales tales como transfección química, choque térmico o electroporación, donde se integra establemente en el genoma de la célula huésped de tal manera que se expresa efectivamente el ácido nucleico recombinante.

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con un método para producir un anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente, que comprende cultivar una célula que comprende una o más secuencias

de polinucleótidos (moléculas) que codifican el anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este bajo condiciones para producir un anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente y recuperar el anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este proveniente de la célula o cultivo celular (p. ej., del sobrenadante). En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con un método para producir un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente, que comprende cultivar una célula que comprende una o más secuencia s de polinucleótido (moléculas) que codifican el anticuerpo biespecífico, o fragmento de unión al antígeno de este en condiciones para producir un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente, y recuperar el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la célula o cultivo celular (p. ej., del sobrenadante). Los anticuerpos expresados o los fragmentos de unión al antígeno de estos pueden recolectarse de las células y purificarse de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la técnica y como se describe en la presente descripción.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de CD33, o fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de

CD33/V δ 2, o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. El término “composición farmacéutica”, como se usa en la presente descripción, significa un producto que comprende un anticuerpo descrito en la presente junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos de la presente descripción y las composiciones que los comprenden son también útiles en la elaboración de un medicamento para las aplicaciones terapéuticas mencionadas en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, el término “portador” se refiere a cualquier excipiente, diluyente, agente de relleno, sal, regulador, estabilizante, solubilizante, aceite, lípido, vesícula que contiene lípidos, microesfera, encapsulación liposomal u otro material bien conocido en la técnica para usar en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador, excipiente o diluyente dependerán de la vía de administración para una aplicación particular. Como se usa en la presente descripción, el término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de una composición de acuerdo con la presente descripción o la actividad biológica de una composición de acuerdo con la presente descripción. De acuerdo con modalidades particulares, en vista de la presente descripción, puede usarse cualquier portador farmacéuticamente aceptable adecuado para usar en una composición farmacéutica de anticuerpo.

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con un método para producir una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, que comprende combinar un anticuerpo de CD33 o fragmento de unión al antígeno de este con un

portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica. En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona a un método para producir una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2, o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente, que

5 comprende combinar un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

MÉTODOS DE USO

- 10 En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con un método para dirigir el CD33 en una superficie de células cancerosas en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al CD33 o un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este o una composición farmacéutica que comprende
- 15 cualquiera, como se describe en la presente descripción. En modalidades particulares, el anticuerpo de CD33, o fragmento de unión al antígeno de este, o anticuerpo de CD33/V δ 2, o fragmentos de unión al antígeno de este o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de ellos, se administran al sujeto (p. ej., humano) que lo necesita en una cantidad terapéuticamente efectiva.
- 20 La actividad funcional de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen al CD33 pueden caracterizarse mediante métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente descripción. Los métodos para caracterizar anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen al CD33

incluyen, pero no se limitan a, ensayos de afinidad y especificidad que incluyen análisis de Biacore, ELISA y OctetRed; ensayos de unión para detectar la unión de anticuerpos al CD33 en las células cancerosas mediante FACS. De acuerdo con modalidades particulares, los métodos para caracterizar los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen al CD33 incluyen los descritos más abajo.

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con un método para tratar un cáncer hematológico en un sujeto que lo necesita, comprende administrar al sujeto un anticuerpo de CD33, un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al CD33 o una composición farmacéutica de la presente descripción. El cáncer hematológico puede, por ejemplo, ser una leucemia, un linfoma y un mieloma. En ciertas modalidades, el cáncer hematológico puede ser leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS, de bajo o alto riesgo), leucemia linfocítica aguda (ALL, que incluye todos los subtipos), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés) o neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN);

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con un anticuerpo de CD33, un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión a antígeno de este o una composición farmacéutica que comprende, como se describe en la presente descripción, para usar en terapia.

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con un anticuerpo de CD33, un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión a antígeno

de este o una composición farmacéutica que comprende, como se describe en la presente descripción, para usar en el tratamiento de un cáncer hematológico.

En otro aspecto general, la presente descripción se relaciona con el uso de un anticuerpo de CD33, un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de
5 unión a antígeno de este o una composición farmacéutica que comprende, como se describe en la presente descripción, en la elaboración de un medicamento para tratar un cáncer hematológico.

El cáncer hematológico puede, por ejemplo, ser una leucemia, un linfoma y un mieloma. En ciertas modalidades, el cáncer hematológico puede ser leucemia mieloide aguda
10 (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS, de bajo o alto riesgo), leucemia linfocítica aguda (ALL, que incluye todos los subtipos), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés) o neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN);

En modalidades particulares, el sujeto con el cáncer hematológico, p. ej., AML o
15 MDS, carece del polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs12459419 en el gen CD33.

En modalidades particulares, el sujeto con el cáncer hematológico, p. ej., AML o MDS, tiene el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs12459419 en el gen CD33.

De acuerdo con las modalidades de la presente descripción, la composición farmacéutica
20 comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de CD33, un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento(s) de unión al antígeno de este. Como se usa en la presente descripción, el término “cantidad terapéuticamente efectiva”

se refiere a una cantidad de un ingrediente activo o componente que provoca la respuesta biológica o medicinal deseada en un sujeto.

Como se usa en la presente descripción con referencia a los anticuerpos de CD33, anticuerpos multiespecíficos de CD33/V δ 2 o fragmentos de unión al antígeno de estos, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad del anticuerpo de CD33, un fragmento multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este, que modula una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita.

De acuerdo con modalidades particulares, una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de terapia que es suficiente para lograr uno, dos, tres, cuatro o más

de los siguientes efectos: (i) reducir o mejorar la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (ii) reducir la duración de la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (iii) prevenir la progresión de la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (iv) provocar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (v) prevenir el desarrollo o el inicio de la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (vi) prevenir la reaparición de la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (vii) reducir la hospitalización de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (viii) reducir la duración de la hospitalización de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (ix) aumentar la supervivencia (p. ej., supervivencia general [OS, en inglés] o supervivencia libre de progresión [PFS, en inglés]) de un sujeto con la enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta; (xi) inhibir o reducir la

enfermedad, trastorno o afección por tratar o un síntoma asociado con esta en un sujeto; y/o (xii) potenciar o mejorar el(los) efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) de otra terapia.

La cantidad o dosificación terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con diversos factores, tales como la enfermedad, trastorno o afección por tratar, los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del sujeto (que incluye, p. ej., edad, peso corporal, salud), si el sujeto es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones de tratamiento se titulan óptimamente para optimizar la seguridad y eficacia.

- 10 De acuerdo con modalidades particulares, las composiciones descritas en la presente se formulan para ser adecuadas para la vía de administración prevista a un sujeto. Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden formularse para ser adecuadas para la administración intravenosa, subcutánea, o intramuscular.

- Como se usan en la presente descripción, los términos “trata”, “tratar” y “tratamiento” pretenden referirse a una mejora o reversión de al menos un parámetro físico medible relacionado con un cáncer que no es necesariamente discernible en el sujeto, pero puede ser discernible en el sujeto. Los términos “trata”, “tratar” y “tratamiento” pueden referirse, además, a provocar la regresión, prevenir la progresión, o al menos ralentizar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección. En una modalidad particular, “tratar,”
- 15 “que trata” y “tratamiento” se refieren a un alivio, prevención del desarrollo o aparición, o reducción en la duración de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, el trastorno o la afección, tales como un tumor o con mayor preferencia un cáncer. En una
- 20 modalidad particular, “trata”, “tratar” y “tratamiento” se refieren a la prevención de la

reaparición de la enfermedad, trastorno o afección. En una modalidad particular, “trata”, “tratar” y “tratamiento” se refieren a un aumento en la supervivencia de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno o afección. En una modalidad particular, “trata”, “tratar” y “tratamiento” se refieren a la eliminación de la enfermedad, trastorno o afección en el

5 sujeto.

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,

10 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.

15 MODALIDADES ENUMERADAS

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, los ejemplos siguientes se destinan para ilustrar, pero sin limitar, el alcance de las invenciones descrita en las reivindicaciones.

20 La modalidad 1 es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD33 humano unido a la membrana (mCD33).

La modalidad 2 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 1, que comprende:

- a. una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 12, 13, y 14, respectivamente; y
- 5 una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1), una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2), y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16, y 17, respectivamente;
- 10 b. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 14, respectivamente; y
- una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de
- 15 cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16, y 17, respectivamente;
- c. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 20, 21, y 14, respectivamente; y
- 20 una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15, 16, y 17, respectivamente; o

- d. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 22, 23, y 24, respectivamente; y
- una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 25, 26, y 17, respectivamente.

La modalidad 3 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 1, que comprende:

- a. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 27, 28, y 29, respectivamente; y
- una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31, y 32, respectivamente;
- b. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 33, 34, y 29, respectivamente; y
- una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31, y 32, respectivamente;
- c. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 35, 36, y 29, respectivamente; y

una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 30, 31, y 32, respectivamente; o

d. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 37, 38, y 39, respectivamente; y

una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 40, 41, y 32, respectivamente.

10 La modalidad 4 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 3, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 42 o 44.

15 La modalidad 5 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 1 o 4, que comprende una VH que comprende la sec. con núm. de ident.: 42 o 44.

La modalidad 6 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 5, que comprende una región variable de cadena

20 ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 43 o 45.

La modalidad 7 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 o 6, que comprende una VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 43 o 45.

La modalidad 8 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 o 7, que comprende una VH que comprende la sec. con núm. de ident.: 42, y una VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 43.

La modalidad 9 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 o 8, que comprende una VH que comprende la sec. con núm. de ident.: 44, y una VL que comprende la sec. con núm. de ident.: 45.

La modalidad 10 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 9, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este comprende un dominio Fc de inmunoglobulina (IgG).

La modalidad 11 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 10, en donde el dominio Fc de IgG es un dominio Fc de IgG1 humana.

La modalidad 12 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 11, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A, T366W e Y407V según el sistema de numeración de EU.

La modalidad 13 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 12, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A, T366W, e Y407V según el sistema de numeración de EU.

La modalidad 14 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende además las mutaciones H435R y/o Y436F según el sistema de numeración de EU.

- 5 La modalidad 15 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende además la mutación triple M252Y/S254T/T256E según el sistema de numeración de EU.

La modalidad 16 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la
10 modalidad 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena pesada únicamente.

La modalidad 17 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 1, en donde el fragmento de unión al antígeno de este es una única región variable de cadena pesada (VHH).

La modalidad 18 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la
15 modalidad 16 o la modalidad 17, que comprende:

- a. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente;
- b. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de
20 cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente;

- c. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente;
 - d. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente; o
 - e. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 111, respectivamente.
- 10 La modalidad 19 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 16 o la modalidad 17, que comprende:
- a. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 55, 56, y 57, respectivamente;
 - 15 b. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 58, 59, y 57, respectivamente;
 - c. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 60, 61, y 57, respectivamente; o
 - 20 d. una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 62, 63, y 64, respectivamente.

La modalidad 20 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 16 a 19, particularmente la modalidad 18, que comprende una VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la sec.

5 con núm. de ident.: 65

La modalidad 21 es el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 20, que comprende una VHH que comprende la sec. con núm. de ident.: 65.

La modalidad 22 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 16 a 21, particularmente la modalidad 19, que

10 comprende una VHH que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 66.

La modalidad 23 es el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 22, que comprende una VHH que comprende la sec. con núm. de ident.: 66.

15 La modalidad 24 es el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 16 a 23 en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este comprende un dominio Fc de inmunoglobulina (IgG).

La modalidad 25 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de cualquiera de las modalidades 16 a 24, en donde el dominio Fc de IgG es un dominio

20 Fc de IgG1 humana.

La modalidad 26 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 16 a 25, en donde el dominio Fc de IgG1 humana

comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A, T366W y Y407V según el sistema de numeración de EU.

La modalidad 27 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 16 a 26, en donde el dominio Fc de IgG1 humana
5 comprende una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S según el sistema de numeración de EU.

La modalidad 28 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 16 a 27, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende una o más mutaciones H435R y/o Y436F según el sistema de
10 numeración de EU.

La modalidad 29 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 16 a 28, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende la triple mutación M252Y/S254T/T256E según el sistema de numeración de EU.

15 La modalidad 30 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 1 a 29, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno se une al dominio C2 de CD33 humana.

La modalidad 31 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las modalidades 1 a 30, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión
20 al antígeno de este no se une a CD33 humana soluble (sCD33).

La modalidad 32 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 31, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este es quimérico.

La modalidad 33 es el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 32, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este es humano o humanizado.

La modalidad 34 es un polinucleótido sintético que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 33.

La modalidad 35 es un vector que comprende el polinucleótido sintético de la modalidad 34.

La modalidad 36 es una célula huésped que comprende el vector de la modalidad 35.

La modalidad 37 es una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1 a 33 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La modalidad 38 es un método para tratar un cáncer hematológico en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de la modalidad 36.

La modalidad 39 es el método de la modalidad 38, en donde el cáncer hematológico es leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), leucemia mieloide crónica (CML) o neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN).

La modalidad 40 es un método para producir el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1-33, que comprende cultivar una célula que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este bajo condiciones para producir el anticuerpo

o el fragmento de unión al antígeno, y recuperar el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de la célula o del cultivo celular.

La modalidad 41 es un método para producir una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 1-33, que comprende combinar el anticuerpo o el
5 fragmento de unión al antígeno de este con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

La modalidad 42 es un anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 que comprende un anticuerpo CD33 o un fragmento de unión a antígeno de este y un anticuerpo de V δ 2
10 o un fragmento de unión a antígeno de este,

en donde el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este se une específicamente a mCD33, y

en donde el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este se une específicamente a la cadena de V δ 2 del receptor de células T V γ 9V δ 2 humano.

15 La modalidad 43 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 42, en donde el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera, que comprende
20 las secuencias amino de:

- a. las sec. con núms. de ident.: 12, 13, 14, 15, 16, y 17, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 18, 19, 14, 15, 16, y 17, respectivamente;
- c. las sec. con núms. de ident.: 20, 21, 14, 15, 16, y 17, respectivamente; o

d. las sec. con núms. de ident.: 22, 23, 24, 25, 26, y 17, respectivamente;
y en donde el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- 5 e. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
- f. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;
- g. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o
- h. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

La modalidad 44 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de
10 unión al antígeno de este de la modalidad 42, en donde el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera, y una CDR3 de cadena ligera, que comprende las secuencias amino de:

- 15 a. las sec. con núms. de ident.: 27, 28, 29, 30, 31, y 32, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 33, 34, 29, 30, 31, y 32, respectivamente;
- c. las sec. con núms. de ident.: 35, 36, 29, 30, 31, y 32, respectivamente; o
- d. las sec. con núms. de ident.: 37, 38, 39, 40, 41, y 32, respectivamente;

y en donde el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este
20 comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- e. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
- f. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;

g. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o

h. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

La modalidad 45 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 42, en donde el anticuerpo de CD33 o el

5 fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de:

a. las sec. con núms. de ident.: 46, 47, y 48, respectivamente;

b. las sec. con núms. de ident.: 49, 50, y 48, respectivamente;

10 c. las sec. con núm. de ident.: 51, 52, y 48, respectivamente;

d. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 76, respectivamente; o

e. las sec. con núms. de ident.: 53, 54, y 111, respectivamente.

y en donde el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3

15 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

f. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;

g. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;

h. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79 respectivamente; o

i. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

20 La modalidad 46 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 42, en donde el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada,

una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias amino de:

- a. las sec. con núms. de ident.: 55, 56, y 57, respectivamente;
- b. las sec. con núms. de ident.: 58, 59, y 57, respectivamente;
- 5 c. las sec. con núms. de ident.: 60, 61, y 57, respectivamente; o
- d. las sec. con núms. de ident.: 62, 63, y 64, respectivamente;

y en donde el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, y una CDR3 de cadena pesada, que comprende las secuencias de aminoácidos de:

- 10 e. las sec. con núms. de ident.: 77, 78, y 79, respectivamente;
- f. las sec. con núms. de ident.: 80, 81, y 79, respectivamente;
- g. las sec. con núms. de ident.: 82, 83, y 79, respectivamente; o
- h. las sec. con núms. de ident.: 84, 85, y 86 respectivamente.

La modalidad 47 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión

15 al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 44, en donde el anticuerpo CD33 o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núms. de ident.: 42 o 44, y una región variable de

cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 %

20 idéntica a la sec. con núms. de ident.: 43 o 45; y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una región variable de cadena pesada solamente (VHH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núms. de ident.: 87.

La modalidad 48 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 47, que comprende:

- a. una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 42, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 43; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87; o
- b. una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 44, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 45; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

La modalidad 49 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42, 45 y 46, en donde el anticuerpo de CD33 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una VHH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 65 o 66; y el anticuerpo de V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende una VHH que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 87.

La modalidad 50 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 49, que comprende:

- a. una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 65; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87; o

- b. una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 66; y una VHH que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 87.

La modalidad 51 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión

5 al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42, 44, 47 y 48, que comprende:

- a. una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 70, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 71; o
 - b. una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 72, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 73; o
- el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42, 45, 46, 49 y 50, que comprende
- c. una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 68; o

- d. una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 74; y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 75.

5 La modalidad 51b es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 51, que comprende:

- a. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 70, y una cadena ligera que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 71;
- b. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 72, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 73;
- 15 c. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 67; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 68;
- d. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 74; y una cadena pesada que comprende la secuencia de
20 aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 75 o
- e. una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 91; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 92.

La modalidad 52 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de cualquiera de las modalidades 42 a 51, en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

5 La modalidad 53 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 52, en donde el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este comprende un dominio Fc de inmunoglobulina (IgG).

10 La modalidad 54 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 53, en donde el dominio Fc de IgG es un dominio Fc de IgG1 humano.

La modalidad 55 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 54, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende una o más mutaciones seleccionadas de T366S, L368A, T366W e Y407V según el sistema de numeración de UE.

15 La modalidad 56 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 55, en donde el dominio Fc de IgG1 humano comprende además una o más mutaciones seleccionadas de L234A, L235A, y D265S según el sistema de numeración de UE.

20 La modalidad 57 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 56, en donde el dominio Fc de IgG1 humana comprende además mutaciones H435R e Y436F según el sistema de numeración de EU.

La modalidad 58 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 57, en donde el dominio Fc de IgG1 humano comprende además la triple mutación M252Y/S254T/T256E según el sistema de numeración de UE.

- 5 La modalidad 59 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 58, en donde el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este se une al dominio C2 del CD33 humana.

- 10 La modalidad 60 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 59, en donde el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este no se une a sCD33.

- 15 La modalidad 61 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 60, en donde el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este es quimérico.

- 20 La modalidad 62 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 61, en donde el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este es humano o humanizado.

La modalidad 63 es un polinucleótido sintético que codifica el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 62.

La modalidad 64 es un vector que comprende el polinucleótido sintético de la modalidad 63.

La modalidad 65 es una célula huésped que comprende el vector de la modalidad 64.

La modalidad 66 es una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42 a 62 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La modalidad 67 es un método para tratar un cáncer hematológico en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de la modalidad 66.

La modalidad 68 es el método de la modalidad 67, en donde el cáncer hematológico es leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), leucemia mieloide crónica (CML) o neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN).

La modalidad 69 es un método para producir el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42-62, que comprende cultivar una célula que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este en condiciones para producir el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este, y recuperar el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de la célula o el cultivo.

La modalidad 70 es un método para producir una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al

antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42-62, que comprende combinar el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

- 5 La modalidad 71 es el anticuerpo multiespecífico de CD33/V δ 2 o el fragmento de unión al antígeno de este de una cualquiera de las modalidades 42-62 o la composición farmacéutica de la modalidad 66 para usar en el tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto que lo necesita, tal como un cáncer hematológico seleccionado de leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfocítica aguda
- 10 (ALL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), leucemia mieloide crónica (LMC) o neoplasia plasmocitoide de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN).

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. GENERACIÓN DE ANTÍGENO CD33

- 15 Las construcciones de expresión que codifican el dominio extracelular (ECD) de CD33 humano o sus subdominios se diseñaron basado en la secuencia del antígeno de la superficie de células mieloides CD33 (núm. de acceso Uniprot P20138) y su anotación de dominio con una secuencia de etiqueta 6X His (sec. con núm. de ident.: 246) o como una proteína de fusión a una variante C34S de albúmina sérica humana (HSA) con una
- 20 secuencia de etiqueta His 6X en el C-terminal. Se diseñaron construcciones de expresión similares que codificaban CD33 (ECD) o sus subdominios del mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) basándose en el N.º de acceso de NCBI

XP_005590138.1. Las secuencias de aminoácidos de los antígenos generados se muestran en la Tabla 5.

Para la expresión transitoria, se transfectaron las construcciones de expresión ECD o subdominio de longitud completa CD33 humano y cyno CD33 en células Expi293 (derivadas de HEK293), usando expifectamina según las pautas del fabricante. Después de la incubación durante 5 días a 37 °C con 8 % de CO₂ en un agitador orbital, las células que expresaban la proteína diana se separaron mediante centrifugación. Las proteínas CD33 solubles portadoras de etiquetas his se purificaron entonces del medio de cultivo usando cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) facilitada por la resina Ni NTA Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). Posteriormente, la purificación incluyó el intercambio regulador en regulador de solución salina de fosfato de 1X Dubelcco a pH 7,2 desprovisto de calcio o magnesio, realizado usando Columnas de Desalación por Centrifugado Zeba™ con un MWCO de 7K, capacidad de 10 ml, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Número de Catálogo ThermoScientific: 89893).

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de los antígenos CD33.

Identidad de proteína AA	Descripción	Secuencia de aminoácidos
C33W1	Fusión N-terminal HSA; CynoCD33ECD-HSA(C34S)-6xHis	DPRVRLEVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPVPYHTRNSPVHG YWFREGAIVSLDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLGDP SRN NCSLSIVDARRRDNGSYFFRMEKGSTKYSYKSTQLSVHVT LTHRPQILIPGALDPDHSKNLTCSVPWACEQGTPIFSWMSA APTSGLRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFPGAGVTTE RTIQLNVSYASQNPRTDIFLGDGSGKQGVVQSGSGSENLY FQGVRSDDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQ SPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLC TVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLV RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFA KRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD

Identidad de proteína AA	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		VFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADP HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCA EDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSAL EVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVK HKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGGGSHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 1)
C33W2	Fusión N-terminal HSA; CD33ECD-Tev- HSA(C34S)-6xHis humano	DPNFWLQVQESVTQEGLCVLVPCTFFHPIPYDKNSPVHG YWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLGDP SRN NCSLSVDARRRDNNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVT LTHRPKILIPGTLEPGH SKNLTCVSWACEQGTPIFSWLSA APTS LGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTE RTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGS GKQETRAGVVHSGSGS ENLYFQGVRRSSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQY LQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFG DKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAK QRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT DLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKEC CEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCC AADP AADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRP CFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAE EGKKLVAA SQAALGLGGGSHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 2)
C33W3	Fusión N-terminal HSA; dominio de tipo V similar a hCD33 Ig (Uniprot P20138, V136-H259) condensado a HSA y la etiqueta 6xHis en C-terminal	DPNFWLQVQESVTQEGLCVLVPCTFFHPIPYDKNSPVHG YWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLGDP SRN NCSLSVDARRRDNNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVT LTHRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFED HV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NL PRLVRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAP ELLFFAKRYK AAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASL QKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTE CCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEK SHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFL GMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRY TKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETYPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKP KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGLHHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 3)

Identidad de proteína AA	Descripción	Secuencia de aminoácidos
C33W4	Fusión N-terminal HSA; dominio de tipo C2 similar a hCD33 Ig (Uniprot P20138, V136-H259) fusionado a HSA y la etiqueta 6xHis en C-terminal	VHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIFS WLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAG VTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHDA HKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVN EVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGE MADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC QAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL ECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE NDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYA RRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF KPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVS TPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLH HHHHH (sec. con núm. de ident.: 4)
C33W8	Dominio de tipo V similar a hCD33_Ig y etiqueta 6xHis	DPNFWLQVQESVTVEEGLCVLPCTFFHPIPIYYDKNSPVHG YWFREGAIIISRDSPVATNKLDEQVEETQGRFRLGDPSPRN NCSLSIVDARRRDNNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVD LTHRGSHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 5)
C33W9	Dominio de tipo C2 similar a Ig hCD33 y etiqueta 6xHis	VHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIFS WLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAG VTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGS HHHHHH (sec. con núm. de ident.: 6)
C33W10	Quimera MuIgV_Hu IgC2 CD33-6xHis_v1	QDLEFQLVAPESVTVEEGLCVHVPCSVFYPSIKLTLGPVTGS WLRKGVSLHEDSPVATSDPRQLVQKATQGRFQLLGDPQKH DCSLFIRDAQKNDTGMYFFRVVREPFVRYSYKKSQSLHVT SLSRTPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIFSWLSA APTS LGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTE RTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGS HHHHH (sec. con núm. de ident.: 7)
C33W12	Quimera MuIgV_cyno IgC2 CD33-6xHis_v1	QDLEFQLVAPESVTVEEGLCVHVPCSVFYPSIKLTLGPVTGS WLRKGVSLHEDSPVATSDPRQLVQKATQGRFQLLGDPQKH DCSLFIRDAQKNDTGMYFFRVVREPFVRYSYKKSQSLHVT SLSRTPQILIPGALDPDHSKNLTCSVPWACEQGTPIFSWMS AAPTSLGLRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFPGAGVTT ERTIQLNVSYASQNPRTDIFLDGSGRKARKQGVVQGS HHHHH (sec. con núm. de ident.: 8)
C33W49	ECD CD33 humano de Uniprot P20138 con	DPNFWLQVQESVTVEEGLCVLPCTFFHPIPIYYDKNSPVHG YWFREGAIIISRDSPVATNKLDEQVEETQGRFRLGDPSPRN NCSLSIVDARRRDNNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVD

Identidad de proteína AA	Descripción	Secuencia de aminoácidos
	la etiqueta 6xHis en C-terminal	LTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSA APTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTE RTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSKGQETRAGVVHGSHHHH HH (sec. con núm. de ident.: 9)
C33W50	ECD CD33 Cyno (D37-Q274) de XP_005590138.1 con la etiqueta 6xHis en C-terminal	DPRVRLEVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPVPYHTRNSPVHG YWFREGAIVSLDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLGDP SRN NCSLSIVDARRRDNGSYFFRMEKGSTKYSYKSTQLSVHVT D LTHRPQILIPGALDPDHSKNLTCSVPWACEQGTPPIFSWMSA APTSGLGLRTTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFPGAGVTTE RTIQLNVSYSQNPRTDIFLGDGSGKQGVVQGSHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 10)
C33W51	ECD CD33 humano (D18-G241) de Uniprot P20138 con la etiqueta 6xHis	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPIPYDKNSPVHG YWFREGAIISRDSVPVATNKLDQEVQEETQGRFRLGDP SRN NCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVT D LTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSA APTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTE RTIQLNVTYVPQNPTTGHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 11)

EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CD33

El proceso de producción de anticuerpos anti-CD33 implicó el uso de tecnologías de ratones transgénicos Ablexis. Inicialmente, los ratones AlivaMab diseñados para producir inmunoglobulinas humanos/ratones fueron inmunizados con proteína CD33 humana recombinante. Se obtuvieron linfocitos de órganos linfoides secundarios y se fusionaron con las células de mieloma de ratón FO para la generación de hibridoma o se sometieron a clasificación individualmente mediante FACS. Los sobrenadantes de hibridoma se sometieron a cribado usando electroquimioluminiscencia MSD para detectar la unión a células HEK que sobreexpresan ECD CD33 humanas. Las muestras positivas se evaluaron además mediante FACS para la confirmación de la unión a ECD de CD33 sobreexpresado, y los aglutinantes celulares confirmados se sometieron a isotipado de cadena ligera mediante ELISA.

Los sobrenadantes de clasificación de células individuales se cribaron para su unión a la proteína CD33 humana recombinante a través de la electroquimioluminiscencia MSD. Se seleccionaron y secuenciaron los aciertos que exhiben el perfil de unión deseado para su posterior análisis. Siguió el proceso de clonación de la región V, que implica la síntesis de ADNc a partir del ARN usando el kit de síntesis de ADNc Smarter, seguido de la amplificación de fragmentos de VH y VL mediante PCR. Posteriormente, los genes VH y VL se clonaron direccionalmente en vectores madre Lonza (VH y VL) usando el kit de clonación In-Fusion® HD. La confirmación de fragmentos completos del gen V se realizó a través de la secuenciación Sanger de ADN minipreparados.

La etapa posterior implicó la expresión de anticuerpos anti-CD33 en células Expicho-S™ a través de transfección transitoria usando ADN plásmido purificado que codifica las proteínas. Las células se mantuvieron en suspensión usando medio de expresión ExPicho™ bajo condiciones ambientales específicas. La transfección se llevó a cabo usando el kit de transfección de CHO ExpiFectamine™, y los sobrenadantes de cultivo se recolectaron después de siete días.

La purificación de proteínas se llevó a cabo cargando el sobrenadante de cultivo celular filtrado en una columna de proteína A Mab Select SuRe, seguido de las etapas de lavado y elución. Las fracciones de proteína eluidas se neutralizaron y se agruparon, seguidas de filtración. La calidad de la proteína purificada se evaluó por HPLC de exclusión por tamaño analítico mediante el sistema Agilent HPLC.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR y las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos ilustrativos generados a través de este método se

describen en la Tabla 6 y la Tabla 7, respectivamente. Las secuencias de polinucleótidos se describen en la Tabla 8.

Tabla 6. Lista de regiones CDR para anticuerpos de CD33 generados a partir de 5 ratones Ablexis.

	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)	CDR2 (sec. con núm. de ident.:)	CDR3 (sec. con núm. de ident.:)
Nombre del anticuerpo de CD33: C33SB1SC1494			
Pesada (AbM)	GFTFDDYTMH (12)	LVSWSGGGSAY (13)	ESAYNAYFDY (14)
Ligera (AbM)	KSSQSVLYSSNNKNY LA (15)	WASTRES (16)	HQFYITPYT (17)
Pesada (KABAT)	DYTMH (18)	LVSWSGGGSAYYVDS VKG (19)	ESAYNAYFDY (14)
Ligera (CHOTHIA)	KSSQSVLYSSNNKNY LA (15)	WASTRES (16)	HQFYITPYT (17)
Pesada (CHOTHIA)	GFTFDDY (20)	SWSGGS (21)	ESAYNAYFDY (14)
Ligera (CHOTHIA)	KSSQSVLYSSNNKNY LA (15)	WASTRES (16)	HQFYITPYT (17)
Pesada (IMGT)	GFTFDDYT (22)	VSWSGGSA (23)	AKESAYNAYFDY (24)
Ligera (IMGT)	QSVLYSSNNKNY (25)	WAS (26)	HQFYITPYT (17)
Nombre del anticuerpo de CD33: C33F1318			
Pesada (AbM)	GFTFSRYWMS (27)	NIKRDGSEKY (28)	NSGTWEFDQ (29)
Ligera (AbM)	TRSSGSIASNDVQ (30)	EDKQRPS (31)	QSYDNNNQV (32)
Pesada (KABAT)	RYWMS (33)	NIKRDGSEKYYVDAV RG (34)	NSGTWEFDQ (29)
Ligera (KABAT)	TRSSGSIASNDVQ (30)	EDKQRPS (31)	QSYDNNNQV (32)
Pesada (CHOTHIA)	GFTFSRY (35)	KRDGSE (36)	NSGTWEFDQ (29)
Ligera (CHOTHIA)	TRSSGSIASNDVQ (30)	EDKQRPS (31)	QSYDNNNQV (32)
Pesada (IMGT)	GFTFSRYW (37)	IKRDGSEK (38)	ARNSGTWEFDQ (39)

	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)	CDR2 (sec. con núm. de ident.:)	CDR3 (sec. con núm. de ident.:)
Ligera (IMGT)	SGSIASND (40)	EDK (41)	QSYDNNNQV (32)

Tabla 7. Lista de regiones variables para anticuerpos de CD33 generados a partir de ratones Ablexis.

CD33 Nombre del anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de regiones variables
C33SB1SC1494	VH: EVQLVESGGDVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAPGKGLEWVS LVSWSGGSAYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLKSEDTALYYCAKES AYNAYFDYWGGGTLTVSS (sec. con núm. de ident.: 42)
C33SB1SC1494	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATYCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKAGQPPE LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVALYYCHQFYITPYTF GQGTKVEIK (sec. con núm. de ident.: 43)
C33F1318	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWMA NIKRDGSEKYYYDAVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARN GTWEFDQWGQGTTLTVSS (sec. con núm. de ident.: 44)
C33F1318	VL: NFMLTQPHSVSESPGKTVIISCTRSSGSIASNDVQWYQQRPGSSPTIVYED KQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDNNNQVFGG GTKLTVL (sec. con núm. de ident.: 45)

- 5 Tabla 8. Secuencias de polinucleótidos de cadena completa para los siguientes anticuerpos de CD33:

C33SB1SC1494_041E121SV7_1.VR1

C33F1318 pesado y ligero

C33SB1SC 1494_041E 121SV7_1. VR1 – Pesada (INS159346) (sec. con núm. de ident.: 97)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATACCATGCACTGG GTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTCTTGTAGTTGGAGT GGTGGTAGCGCATACTATGTAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA GACAACAGCAAAAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACA CCGCCCTGTATTACTGTGCAAAGAAAGTGCATATAATGCCTACTTTGACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
C33SB1SC 1494_041E 121SV7_1. VR1 – Ligera (INS159345) (sec. con núm. de ident.: 98)	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG GCCACCATCTACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTATTTATACAGCTCCAACAATAAGA ACTACTTAGCTTGGTACCAACAGAAGGCAGGACAGCCTCCTGAACTGCTCATTTA CTGGGCATCTACCCGGGAGTCCGGGGTCCCTGACCGATTGAGTGGCAGCGGGT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAGGATGTGGCAC TTTATTACTGTCACCAATTTTATATTACTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAG GTGGAGATCAAA
C33F1318 – Pesada (INS171943) (sec. con núm. de ident.: 99)	GAGGTCCAACCTTGTGGAGTCAGGCGGCGGCCTCGTGCAACCAGGGGGTAGTTT GCGCCTGAGTTGCGCTGCCAGCGGGTTTACTTTCTCACGATATTGGATGAGTTG GGTTTCGACAGGCACCTGGGAAGGGACTCGAGTGGATGGCTAATATCAAGAGGG ATGGATCTGAAAAATACTATGTTCGATGCCGTCAGGGGTCGATTTACCATTCTCG TGACAATGCTAAAACTCCCTTTACCTGCAAATGAACAGTTTGAGAGCTGAAGATA CAGCAGTCTATTATTGTGCTCGCAATAGCGGCACCTGGGAATTTGACCAATGGGG ACAAGGTACACTTGTAACAGTCTCCTCA
C33F1318 – Ligera (INS171944) (sec. con núm. de ident.: 100)	AATTTTATGCTTACACAGCCCCATTCTGTTTCCGAAAGCCCAGGCAAGACCGTTA TCATCTCTTGACCCGATCAAGCGGGTCTATAGCTTCCAACGACGTACAATGGTA CCAACAGAGGCCAGGCAGCAGTCCACCATTGTCAATTTATGAGGATAAACAGCG TCCATCTGGAGTACCCGACCGTTTTAGTGGATCTATTGATTCCAGCTCAAACCTCC GCATCTCTGACTATAAGTGGGCTGAAGACTGAGGATGAAGCCGACTACTATTGTC AATCATACGACAACAACAATCAGGTATTTGGTGGCGGCACCAAGCTCACCGTGCT T

Los anticuerpos de CD33 de cadena pesada única se derivaron de una campaña de muestra de fagos VHH. Las secuencias de aminoácidos de las CDR y las regiones variables de cadena pesada (VHH) de anticuerpos ilustrativos generados a través de este método se describen en la Tabla 9 y la Tabla 10, respectivamente. Las secuencias de polinucleótidos se describen en la Tabla 11.

Tabla 9. Lista de Regiones CDR para anticuerpos de CD33 generados a partir de llamas.

	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)	CDR2 (sec. con núm. de ident.:)	CDR3 (sec. con núm. de ident.:)
Nombre del anticuerpo de CD33: JL45-VHH			
Pesada (AbM)	GSIFSIFDMG (46)	RITNGGITN (47)	DIAANIGSNILYDDY (48)
Pesada (KABAT)	IFDMG (49)	RITNGGITNYLDSVK G (50)	DIAANIGSNILYDDY (48)
Pesada (CHOTHIA)	GSIFSIF (51)	TNGGI (52)	DIAANIGSNILYDDY (48)
Pesada (IMGT)	GSIFSIFD (53)	ITNGGIT (54)	YADIAANIGSNILYDDY (76) o YADIAANIGSNIL (111)
Nombre del anticuerpo de CD33: AB266_1_CD33_B12_P09.VR1			
Pesada (AbM)	GSIFSINAMG (55)	RITGGGATD (56)	DLVTRVGSDLLYDDY (57)
Pesada (KABAT)	INAMG (58)	RITGGGATDYVDSVK G (59)	DLVTRVGSDLLYDDY (57)
Pesada (CHOTHIA)	GSIFSIN (60)	TGGGA (61)	DLVTRVGSDLLYDDY (57)
Pesada (IMGT)	GSIFSINA (62)	ITGGGAT (63)	YADLVTRVGSDLLYDD Y (64)

Tabla 10. Regiones variables de cadena pesada para anticuerpos de CD33 generados a partir de llamas.

CD33 Nombre del anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de regiones variables
JL45	VHH: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGSIFSIFDMGWYRRPPGAQRELVARI TNGGITNYLDSVKGRFSISRDNANTVYLQMNSLNAEDTAVYYCYADIAANI GSNILEDDYWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 65)
AB266_1_CD33_B12_P09.VR1	VHH:

	EVQVVESGGGLVQGGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYHQAPGKQRELVARI TGGGATDYVDSVKGRFTISLDSAKSTVYLQMNSLKPEDTAVYHCYADLVTR VGSDLLYDDYWGGGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 66)
--	--

Tabla 11. Secuencias de polinucleótidos de cadena completa para los anticuerpos de CD33:

B266_1_CD33_B12_P09.VR1

5 JL45

ID	Secuencia del polinucleótido
AB266_1_C D33_B12_P 09.VR1 (INS241328) (sec. con núm. de ident.: 95)	GAAGTTCAAGTTGTGCAATCTGGCGGCGGGCTTGTGCAAGGTGGTGGGTCATTG AGGCTGTCTTGTGCTGCATCTGGTTCCATCTTCAGCATTAAACGCCATGGGTTGGT ATCATCAAGCACCCGGCAAACAGAGGGAAGTGGTGGCAAGAATTACTGGAGGA GGAGCTACCGATTATGTGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTCACAATCAGTCTGGATT CAGCTAAGTCTACAGTCTATCTGCAAATGAACTCACTCAAACCAGAAGATACAGC AGTCTACCATTGTTATGCAGATCTTGTGACAAGAGTGGGATCTGATCTTCTGTAC GACGATTATTGGGGTCAAGGAACTCAAGTTACTGTGTCAAGT
JL45 (INS242239) (sec. con núm. de ident.: 96)	CAAGTGCAACTTGTGGAAAGTGGTGGCGGACTTGTGCAAGCTGGTGGCTCATTG AGGCTGTCTTGTGAAGCATCTGGCTCAATCTTCAGCATCTTTGATATGGGTTGGT ATAGAAGACCTCCCGGGGCTCAGAGAGAACTGGTGGCTAGAATCACAAATGGTG GGATTACCAATTACCTCGATTTCAGTTAAGGGAAGGTTCTCTATTTCCAGAGACAA TGCCAAGAATACTGTGTACTTGCAAATGAACAGCTTGAATGCCGAAGATACAGCC GTGTACTATTGTTACGCAGATATTGCAGCAAACATTGGCTCAAACATTCTGTACG ATGACTATTGGGGTCAAGGAACACAAGTTACAGTCAGTTCT

EJEMPLO 3. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS DE CD33/Vδ2.

Las moléculas biespecíficas se desarrollaron mediante la implementación de mutaciones botón en ojal, creando heterodímeros consistentes en un aglutinante CD33 fusionado a Fc y un aglutinante de Vδ2 fusionado a Fc. En estas construcciones, el aglutinante CD33 se encuentra en el ojal Fc, mientras que el aglutinante de Vδ2 está en el Botón Fc. Para lograr esto, en una modalidad, la región constante CD33 VH y CH1 humana se combinan con una bisagra en Fc, que presenta

varias

mutaciones:

L234A/L235A/D265S_M252Y/S254T/T256E_T366S/L368A/Y407V_H435R/Y436F; y

el aglutinante de Vδ2 está fusionado a la bisagra y Fc de botón, incorporando las

siguientes

mutaciones:

5 C220S_L234A/L235A/D265S_M252Y/S254T/T256E_T366W. Con respecto al anticuerpo biespecífico CD33xVδ2, el brazo Vδ2 puede prepararse como se describe en la sección Ejemplos de la solicitud de patente WO 2015/156673A1 y WO 2023/037333 A1. Las secuencias de unión Vδ2 utilizadas se derivaron del WO2023/037333 (ver la Tabla 10 y la Tabla 11 a continuación). La técnica ya
10 proporciona las enseñanzas necesarias para que el experto en la técnica prepare el anticuerpo biespecífico de CD33xVδ2 de la descripción, teniendo conocimiento de las secuencias reales de los dos brazos, como se proporciona en la presente descripción.

Las mutaciones AAS (L234A/L235A/D265S) se introducen deliberadamente en la
15 porción Fc de ambas cadenas pesadas para reducir la unión del receptor Fc. Adicionalmente, las mutaciones YTE (M252Y/S254T/T256E) se incorporan en ambas cadenas pesadas para extender la media vida de los anticuerpos biespecíficos. Se introducen las mutaciones de RF en la cadena pesada del ojal para ayudar en la purificación. Estas mutaciones de RF pueden introducirse en la cadena pesada de
20 ojales del brazo CD33, como se ha descrito anteriormente en la presente descripción o como en la sec. con núm. de ident. 34, o en la cadena pesada de ojal del brazo Vδ2 como en la sec. con núm. de ident. 35. Alternativamente, estas mutaciones de RF pueden ser introducidas en ambas cadenas pesadas.

El anticuerpo biespecífico CD33xVδ2 puede producirse mediante el cultivo de células de ovario de hámster chino recombinantes, seguido de aislamiento, purificación cromatográfica, y formulación.

En particular, las moléculas de proteína (cada brazo CD33 y Vδ2) pueden
5 coproducirse en una línea celular CHO mediante cotransfección de cada uno de los plásmidos de expresión codificantes y pueden purificarse usando un proceso de dos etapas que implica la captura de ProA seguida de captura de afinidad CH1. Inicialmente, los anticuerpos pueden someterse a purificación a través de una columna de proteína A Mab Select SuRe de GE Healthcare. La columna puede
10 prepararse con PBS a pH 7,2 y después se carga con sobrenadante de fermentación a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Después de la carga, la columna puede someterse a un lavado con 4 volúmenes de columna de PBS, seguido de una elución usando 30 mM de acetato de sodio a pH 3,5. Las fracciones que contienen picos de proteína, detectadas por absorbancia a 280 nm, pueden combinarse y su pH
15 neutralizarse a 5,0 usando una solución al 1 % de 3M acetato de sodio a pH 9,0.

Las variantes de las secuencias descritas en la presente comprenden preferentemente modificaciones conservadoras de la secuencia dada a conocer. "Modificaciones conservadoras" se refiere a las modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión
20 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, 5 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., 10 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 de los 15 anticuerpos de la descripción se pueden realizar mediante métodos conocidos, por ejemplo, mediante mutagénesis por PCR (patente de los EE. UU. núm. 4.683.195). 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, 20 Trp). Pueden probarse las características de las variantes resultantes usando ensayos descritos en la presente.

Tabla 12. Lista de regiones CDR para el anticuerpo de V δ 2 generado a partir de llamas

Nombre del anticuerpo de Vδ2: LAVA177	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)	CDR1 (sec. con núm. de ident.:)
Pesada (AbM)	GRPFSNYGMG (77)	GISWSGGSTD (78)	VFSGAETAYPSDDYDY (79)
Pesada (KABAT)	NYGMG (80)	GISWSGGSTDYADSV KG (81)	VFSGAETAYPSDDYDY (79)
Pesada (CHOTHIA)	GRPFSNY (82)	SWSGGS (83)	VFSGAETAYPSDDYDY (79)
Pesada (IMGT)	GRPFSNYG (84)	ISWSGGST (85)	AAVFSGAETAYPSDDY DY (86)

Tabla 13. Región variable de cadena pesada para el anticuerpo de Vδ2 generado a partir de llamas

Nombre del anticuerpo de Vδ2	Secuencia de aminoácidos de regiones variables
LAVA177	VHH: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYGMGWFRQAPGKKREFVAGIS WSGGSTDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVFSGAET AYPSDDYDYWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 87)

- 5 En estas construcciones, el aglutinante de CD33 se ubicó en el Agujero Fc, mientras que el aglutinante de Vδ2 estaba en el Botón Fc. Para lograr esto, la región constante CD33 VH y CH1 humana se combinaron con una bisagra en Fc, que presenta varias mutaciones:
L234A/L235A/D265S_M252Y/S254T/T256E_T366S/L368A/Y407V_H435R/Y436F.
- 10 Estas mutaciones se introdujeron deliberadamente en la porción Fc de ambas cadenas pesadas para reducir la unión del receptor Fc. Adicionalmente, las mutaciones YTE (M252Y/S254T/T256E) se incorporaron a ambas cadenas pesadas de para extender la media vida de los anticuerpos biespecíficos.

En el caso de los aglutinantes CD33 VHH, la VHH se combinó con una bisagra en Fc, presentando varias mutaciones:

L234A/L235A/D265S_M252Y/S254T/T256E_T366S/L368A/Y407V_H435R/Y436F.

El aglutinante de Vδ2 se fusionó a la bisagra y al Botón Fc, incorporando las siguientes mutaciones:

C220S_L234A/L235A/D265S_M252Y/S254T/T256E_T366W.

Se introdujeron las mutaciones de RF en la región Fc de la cadena pesada para ayudar en la purificación.

Las moléculas se produjeron en una línea celular CHO mediante cotransfección de los plásmidos de expresión codificantes y se purificaron usando un proceso de dos etapas que implica captura de ProA seguido de captura de afinidad CH1. Inicialmente, los anticuerpos se sometieron a purificación a través de una columna de proteína A Mab Select SuRe de GE Healthcare. La columna se preparó con PBS a un pH 7,2 y se cargó con sobrenadante de fermentación a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Después de la carga, la columna se sometieron a un lavado con 4 volúmenes de columna de PBS, seguido de una elución usando 30 mM de acetato de sodio a pH 3,5. Las fracciones que contienen picos de proteína, detectadas por absorbancia a 280 nm, se combinaron y su pH neutralizarse a 5,0 usando una solución al 1 % de 3M acetato de sodio a pH 9,0. Posteriormente, los anticuerpos se sometieron a una purificación adicional mediante captura de CH1 en caso de que el brazo anti-CD33 fuera un Fab y se eluyeran usando un regulador de histidina.

En la Tabla 14 se presentan las cadenas pesadas y/o ligeras para anticuerpos biespecíficos de CD33 X Vδ2 ilustrativos.

Tabla 14: Anticuerpos biespecíficos CD33 x Vδ2

Ident. del biespecífico:		Secuencia de aminoácidos
GD33B273	Cadena pesada 1 LAVA177 (brazo de Vδ2) (sec. con núm. de ident.: 67)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYGMGWRQAP GKKREFVAGISWSGGSTDYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYWGQGTQVTVS SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREP EVTCTVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Cadena pesada 2 JL45 (brazo de CD33) (sec. con núm. de ident.: 68)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGSIFSIFDMGWYRRPPG AQRELVARITNGGITNYLDSVKGRFSISRDNANTVYLQMNSLN AEDTAVYYCYADIAANIGSNILYDDYWGQGTQVTVSSEPKSSD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVS VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN RFTQKSLSLSPGK
GD33B112	Cadena pesada 1 LAVA177 (brazo de Vδ2) (sec. con núm. de ident.: 67)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYGMGWRQAP GKKREFVAGISWSGGSTDYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYWGQGTQVTVS SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREP EVTCTVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Cadena pesada 2 C33SB1SC1494 (sec. con núm. de ident.: 70)	EVQLVESGGDVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAP GKGLEWVSLVSWSGGSAYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLKSEDTALYYCAKESAYNAYFDYWGQGTQVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLY ITREPEVTCVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
	Cadena ligera 2 C33SB1SC1494 (sec. con núm. de ident.: 71)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATYICKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQ KAGQPELLIYWASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV ALYYCHQFYITPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
GD33B116	Cadena pesada 1 LAVA177 (brazo de	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYGMGWRQAP GKKREFVAGISWSGGSTDYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYWGQGTQVTVS SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREP

Ident. del biespecífico:		Secuencia de aminoácidos
	Vδ2) (sec. con núm. de ident.: 67)	EVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Cadena pesada 2 C33F1318 (sec. con núm. de ident.: 72)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAP GKGLEWMANIKRDGSEKYYVDAVRGRFTISRDNANKSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARNSGTWEDQWGQGTLLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLY ITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
	Cadena ligera 2 C33F1318 (sec. con núm. de ident.: 73)	NFMLTQPHSVSESPGKTVIISCTRSSGSIASNDVQWYQQRPGSS PTIVYEDKQRPSPGVDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDNNNQVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
GD33B139	Cadena pesada 1 (brazo de Vδ2) (sec. con núm. de ident.: 74)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFNSNYGMGWRQAP GKKREFVAGISWSGGSTDYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYWGQGTQVTVS SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREP EVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNRTQKSLSLSPGK
	Cadena pesada 2 AB266_1_CD33_B1 2_P09 (sec. con núm. de ident.: 75)	EVQVVESGGGLVQGGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYHQAPG KQRELVARITGGGATDYVDSVKGRFTISLDSAKSTVYLQMNSL KPEDTAVYHCYADLVTRVGSDDLDDYWGQGTQVTVSSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

Tabla 15. Secuencias de polinucleótidos de cadena completa para los siguientes anticuerpos de CD33:

GD33B273

5 GD33B112 pesado y ligero

GD33B273 – Cadena pesada 1 (PBD203084) (sec. con núm. de ident.: 101)	GAAGTTCACGCTGGTTGAAAGTGGTGGTGCCCTTGTGCAAGCCGGTGGCT CATTACGCTTGTCTATGTCAGCCTCTGGAAGACCTTTTACGCAATTATGGGA TGGGGTGGTTTTAGACAAGCACCCGGAAAGAAACGCGAGTTTTGTTGCTGGC ATTTTCATGGAGTGGCGGAAGTACAGATTATGCAGATTCTGTAAAGGACG CTTTACAATTAGTCGGGACAACGCAAAGAATACCGTGTATCTCCAGATGAA TAGCCTTAAGCCAGAAGATACAGCCGTTTTATTATTGTGCCGCTGTTTTCTC TGGTGCTGAAACTGCATACTATCCATCAGACGACTACGATTATTGGGGTCA AGGAACTCAAGTGACAGTTTCTAGTGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTC ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGT CTTCTCTTCCCCCCTAAAACCAAGGACACCCTCTACATCACCCGGGAGC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTGTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA
GD33B273 – Cadena pesada 2 (PBD203084) (sec. con núm. de ident.: 102)	CAAGTGCAACTTGTGGAAAGTGGTGGCGGACTTGTGCAAGCTGGTGGCT CATTGAGGCTGTCTTGTGAAGCATCTGGCTCAATCTTCAGCATCTTTGATA TGGGTTGGTATAGAAGACCTCCCGGGGCTCAGAGAGAACTGGTGGCTAG AATCACAAATGGTGGGATTACCAATTACCTCGATTAGTTAAGGGAAGGTT CTCTATTTCCAGAGACAATGCCAAGAATACTGTGTACTTGCAAAATGAACAG CTTGAATGCCGAAGATACAGCCGTGTACTATTGTTACGCAGATATTGCAGC AAACATTGGCTCAAACATTCTGTACGATGACTATTGGGGTCAAGGAACACA AGTTACAGTCAGTTCTGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCTACATCACCCGGGAGCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGACACAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAAGGTGTCCAA CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCG AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCGTGA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGGTTACGCAGAAAGTCTC TCTCCCTGTCTCCGGGAAAA

GD33B112 – Cadena pesada 1 (PBD142624) (sec. con núm. de ident.: 103)	GAAGTGC AATTAGTGGAAAGTGGTGGTGGTCTGGTGCAGGCTGGCGGAA GCCTGAGACTGTCTTGCTGCTGCCTCTGGCCGGCCATTTTCCAAC TACGGC ATGGGCTGGTT CAGGCAGGCCCTTGCCAAGAAAAGAGAGTTCTGTGGCCG GCATCTCCTGGTCCGGCGGCTCTACAGATTACGCCGACTCCGTGAAGGG CAGATT CACCATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACACCGTCTACCTGCAGA TGAAC TCCCTGAAGCCTGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCGCCGT GTT CAGCGGAGCTGAAACCGCCTACTATCCTTCCGACGACTACGACTACT GGGGCCAGGGCACC CAAGTGACCGTGTCTCTGAGCCCAAATCTAGCGA CAA AACTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGA CCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCTACATCAC CCGGGAGCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGT GAGCGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCTCACC GTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTGT CGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGTGGTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGATGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA
GD33B112 – Cadena pesada 2 (PBD167215) (sec. con núm. de ident.: 104)	GAAGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGGACGTAGTGCAACCTGGCGGC AGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTT CACCTTCGACGACTACA CCATGCACTGGGTGAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAG CCTGGT GAGCTGGAGCGGCGGCAGCGCCTACTACGTGGACAGCGTGAAG GGCAGATT CACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTCAAGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGCCAAG GAGAGCGCCTACAACGCCTACTTCGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGA ACTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGTCCAC CGTGCC CAGCACCTGAAGCCGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCGAAAACCCAAGGACACCTCTACATACCCCGGAGCCTGAGGTACAT GCGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCTCACC GTCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGT CAGCCTGTCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCGT GAGCA AGCTACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGGTT CACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGAAAA
GD33B112 – Cadena ligera 2 (PBD167214)	GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCG AGAGAGCCACCATCTACTGCAAGAGCTCTCAGAGCGTGCTGTACAGCAGC AACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGGCCGGACAGCCTC

(sec. con núm. de ident.: 105)	CTGAGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCACAAAGAGAGAGCGGGCTGCCTGA CAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGC AGCCTGCAAGCCGAGGACGTGGCCCTGTACTACTGCCATCAGTTCTACAT CACCCTTACACCTTCGGCCAAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACG GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCA GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGT
GD33B116 - Cadena pesada 1 (PBD142624) (sec. con núm. de ident.: 106)	GAAGTGCAATTAGTGGAAGTGGTGGTGGTCTGGTGCAGGCTGGCGGAA GCCTGAGACTGTCTTGCTGCCTCTGGCCGGCCATTTTCCAAGTACGGC ATGGGCTGGTTCAGGCAGGCCCCCTGGCAAGAAAAGAGAGTTCTGGCCG GCATCTCCTGGTCCGGCGGCTCTACAGATTACGCCGACTCCGTGAAGGG CAGATTCACCATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACACCGTCTACCTGCAGA TGAAGTCCCTGAAGCCTGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCGCCGT GTTACGCGGAGCTGAAACCGCCTACTATCCTTCCGACGACTACGACTACT GGGGCCAGGGCACCCAAGTGACCGTGTCTCTGAGCCCAAATCTAGCGA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGA CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCTACATCAC CCGGGAGCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTGTGGAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA
GD33B116 - Cadena pesada 2 (PBD156894) (sec. con núm. de ident.: 107)	GAGGTCCAACCTTGTGGAGTCAGGCGGCGGCCTCGTGCAACCAGGGGGTA GTTTGCGCCTGAGTTGCGCTGCCAGCGGGTTTACTTTCTCACGATATTGG ATGAGTTGGGTTGACAGGCACCTGGGAAGGGACTCGAGTGGATGGCTA ATATCAAGAGGGATGGATCTGAAAAATACTATGTGATGCCGTGAGGGT CGATTTACCATTTCTCGTGACAATGCTAAAACTCCCTTTACCTGCAAATGA ACAGTTTGAGAGCTGAAGATACAGCAGTCTATTATTGTGCTCGCAATAGCG GCACTTGGGAATTTGACCAATGGGGACAAGGTACACTTGTAAACAGTCTCC TCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAACACCAAGGTGGAGCAAGAAAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGTCCACCGTGCCAGCACC TGAAGCCGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCTACATACCCGGGAGCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGA GCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC

		AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGTCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG GACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCGGTTACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GAAAA
GD33B116 – Cadena ligera 2 (PBD156378) (sec. con núm. de ident.: 108)		AATTTTATGCTTACACAGCCCCATTCTGTTTCCGAAAGCCCAGGCAAGACC GTTATCATCTCTTGACCCGATCAAGCGGGTCTATAGCTTCCAACGACGTA CAATGGTACCAACAGAGGCCAGGCAGCAGTCCCACCATTGTATTTATGA GGATAAACAGCGTCCATCTGGAGTACCCGACCGTTTTAGTGGATCTATTG ATTCCAGCTCAAACCTCCGCATCTCTGACTATAAGTGGGCTGAAGACTGAG GATGAAGCCGACTACTATTGTCAATCATACGACAACAACAATCAGGTATTT GGTGGCGGCACCAAGCTCACCGTGCTTGGTCAGCCCAAGGCTGCACCCA GTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCC ACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGC CTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACA CCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCT GACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACG CATGAAGGGAGCACCGTGAGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA
GD33B139 – Cadena pesada 1 (PBD171082) (sec. con núm. de ident.: 109)		GAAGTGCAATTAGTGGAAGTGGTGGTGGTCTGGTGCAGGCTGGCGGAA GCCTGAGACTGTCTTGCTGCTGCTCTGGCCGGCCATTTTCCAACCTACGGC ATGGGCTGGTTCAGGCAGGCCCTGGCAAGAAAAGAGAGTTCTGGCCG GCATCTCCTGGTCCGGCGGCTCTACAGATTACGCCGACTCCGTGAAGGG CAGATTACCATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACACCGTCTACCTGCAGA TGAACCTCCTGAAGCCTGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCGCCGT GTTACAGCGGAGCTGAAACCGCCTACTATCCTTCCGACGACTACGACTACT GGGGCCAGGGCACCCAAGTGACCGTGTCTCTGAGCCCAAATCTAGCGA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGA CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCTACATCAC CCGGGAGCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAAGCTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCTCACCCTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTGTGCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGTGGTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC GGTTCACGCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA
GD33B139 – Cadena pesada 2 (PBD171087) (sec. con núm. de ident.: 110)		GAAGTGCAAGTGGTGGAAAGTGGTGGTGGTCTCGTGAGGGCGGCGGAA GCCTGAGACTGTCTTGCTGCTGCTTCTGGCTCTATCTTCTCCATCAACGCTA TGGGCTGGTATCACCAGGCTCCTGGCAAGCAGCGGGAAGTGGTGGCCCG GATCACCGGCGGAGGCGCTACCGACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCAGA TTCACCATCTCTCTGGATTCTGCCAAGTCCACAGTGTACCTGCAGATGAAC TCCCTGAAACCCGAGGACACCGCCGTGTACCACTGCTACGCCGATCTGGT CACCAAGTGGGCTCCGACCTGCTGTACGACGACTACTGGGGCCAAGGC ACCCAGGTGACCGTGTCCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACAC ATGTCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCTACATACCCGGGAGCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGAAGCTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG

	TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTCCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
--	---

Se sintetizó y ensayó una molécula adicional. GD33B134 es idéntico a GD33B273 excepto que las sustituciones H435R e Y436F (sustituciones de RF) están en la cadena pesada 1 en lugar de la cadena pesada 2.

5 Tabla 16.

Ident. del biespecífico:		Secuencia de aminoácidos
GD33B134	Cadena pesada 1 LAVA177 (brazo de Vδ2) (sec. con núm. de ident.: 91)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFNSNYGMGWFR QAPGKKREFVAGISWSSGSTDYADSVKGRFTISRDNANKN TVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSL SLSPGK
	Cadena pesada 2 JL45 (brazo de CD33) (sec. con núm. de ident.: 92)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGSIFSIFDMGWYRR PPGAQRELVARITNGGITNYLDSVKGRFSISRDNANKNTVYL QMNSLNAEDTAVYYCYADIAANIGSNILYDDYWGQGTQVT VSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKDTLY ITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tabla 17. El anticuerpo NullxVδ2, que carece de un brazo de unión a CD33, y se usa para comparación con los anticuerpos CD33xVδ2 biespecíficos descritos en la presente, tiene las siguientes secuencias:

Ident. del biespecífico:		Secuencia de aminoácidos
GD33B73 NullxVδ2	Cadena pesada 1 (sec. con núm. de ident.: 95)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQ PPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVV LTMTNMDPVDATATYYCARLYGFTYGFAYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNRFTQKSLSLSPGK
	Cadena ligera 1 (sec. con núm. de ident.: 96)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVVDYNGISYMHY QQKPGQPPKLLIYAASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQIIEDPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
	Cadena pesada 2 LAVA177 (brazo de Vδ2) (sec. con núm. de ident.: 67)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSSNYGMGWFR QAPGKKREFVAGISWGGSTDYADSVKGRFTISRDNANKN TVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLYITREPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

EJEMPLO 4. LOS ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS DIRIGIDOS A CD33 X Vδ2

EXHIBEN AFINIDAD DE UNIÓN HACIA LAS CÉLULAS Vy9Vδ2.

5 Se emplearon los siguientes materiales y métodos:

Para evaluar la unión de Vδ2, se incubaron células T Vy9Vδ2 a 37 °C durante 60 minutos con concentraciones variables (que van de 300 a 0,00508 nM) del anticuerpo biespecífico GD33B273 o con una variante carente del brazo de unión CD33 NullxVδ2, también conocida como GD33B73. La detección del anticuerpo de Vδ2 unido se logró incubando

10 con el anticuerpo de detección secundaria camélido-anti-VHH AF647 de anticonejo de

MonoRab™ (GenScript, A02019-200) durante 30 minutos a 4 °C. Se usó FACS Lyric (BD) para medir muestras, y se empleó el software FlowJo (FlowJo) para el análisis de datos. Los resultados revelaron que el anticuerpo biespecífico de CD33 x Vδ2 GD33B273 se une a las células positivas Vδ2, p. ej., las células T Vγ9Vδ2 (ver Figura 1). El
 5 anticuerpo NullxVδ2 GD33B73 también exhibió unión a las células T Vγ9Vδ2.

EJEMPLO 5. EVALUACIÓN DE LA UNIÓN A CD33 SOLUBLE

Se realizaron experimentos para demostrar la especificidad de unión de anticuerpos
 10 biespecíficos CD33 X Vδ2 a CD33 unido a membrana (mCD33).

Materiales y métodos: Se mezclaron muestras de suero que contenían CD33 soluble (sCD33) de pacientes (p. ej., pacientes con AML) con concentraciones especificadas del anticuerpo biespecífico CD33 X Vδ2 de prueba (molécula de prueba). La unión de la molécula de prueba a CD33 soluble se determinó capturando CD33 soluble unido a la
 15 molécula de prueba usando microesferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo antimolécula. Este proceso eliminó efectivamente el complejo formado de la solución. Posteriormente, el suero sobrenadante se sometió a análisis usando LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas) para identificar CD33 soluble en las muestras de suero. El ensayo LC-MS se formuló específicamente para cuantificar la
 20 cantidad de sCD33 no unido en los sueros de pacientes con AML posterior a la adición del anticuerpo especificado. Los niveles comparables de CD33 soluble detectados tanto en las muestras tratadas con la molécula de prueba como en las muestras no tratadas con la molécula de prueba (0 nM de muestras) indicaron una falta de unión entre la

molécula de prueba y CD33 soluble en el suero. El anticuerpo JL-5 (Ab anti-CD33, que no es específico de mCD33; WO2023037333 incorporado por referencia en su totalidad), se usó como control positivo para confirmar la unión a CD33 soluble en el suero. Las secuencias de JL5 se describen en la Tabla 18.

5 Tabla 18: Secuencias de anticuerpo JL5

JL5 (C33B1517)	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHISTGNI HYNPSLKSRVTMSVDTSNQFSLKLRVTAADTAVYYCARDNGAALFDYWGQGTLV TVSS (sec. con núm. de ident.: 93)
JL5 (C33B1517)	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNIVNWWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPS GVPDRVSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGPGTKVTVL (sec. con núm. de ident.: 94)

Resultados: Las figuras 2A-2D mostraron una unión limitada de los diversos anticuerpos biespecíficos CD33xVδ2 probados a sCD33, lo que demuestra que estos anticuerpos se unen específicamente a mCD33. Por el contrario, el anticuerpo de referencia JL5 es inespecífico y muestra una unión dependiente de la dosis a sCD33.

EJEMPLO 6: LOS ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS DE CD33 X Vδ2 PUEDEN MEDIAR LA CITOTOXICIDAD CONTRA LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN CD33

El ensayo de citotoxicidad se realizó usando los siguientes materiales y métodos: Las células diana THP1 (línea celular monocítica de leucemia humana, disponible de SIGMA ALDRICH o de ATCC) se marcaron con el kit de proliferación CellTrace CFSE (Thermo Scientific, C34554) y después se incubaron a 37 °C junto al anticuerpo CD33xVδ2 biespecífico o un anticuerpo de control negativo (NullxVδ2, también conocido como GD33B73) en presencia de células T Pan (E) en la relación (E:T) 10:1, que comprende 200.000 células efectoras y 20.000 células diana. Se ensayó una serie de concentración

de anticuerpos, comenzando en 300 nM e incluyendo 12 de diluciones 4 veces, para GD33B112, GD33B116, GD33B134, GD33B273, así como el control negativo Null x Vδ2 (GD33B73). Después de 72 horas de incubación, las células muertas se tiñeron usando el tinte de viabilidad fijable eBioscience eFluor 780 (Thermo Scientific, 65-0865). Se utilizó

5 citometría de flujo para el análisis de muestras. La determinación de la muerte de células cancerosas se basó en el cálculo de células cancerosas vivas como porcentaje relativo a los pocillos no tratados. El trazado y el análisis se realizaron usando el software Prism (GraphPad).

Resultados del ensayo de citotoxicidad: Se realizó la medición de la muerte celular

10 THP1. No se detectó muerte observable con anticuerpos de control negativo. Sin embargo, los anticuerpos CD33xVδ2 biespecíficos exhibieron la capacidad de inducir la muerte de células tumorales THP-1 (Figura 3 y Figura 6).

EJEMPLO 7: EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS DE CD33 X Vδ2 BIESPECÍFICOS

15 MEDIANTE ANÁLISIS DE RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL

Se utilizó un instrumento Biacore 8k (Cytiva, cytivalifesciences.com) para experimentos de unión SPR mediante la captura de los anticuerpos de prueba en un chip SPR sensor CM4 con anti-FC de cabra. El antígeno CD33 se fluyó a 100, 33, 11

20 y 3,7 nM en modo cinético de ciclo único. El regulador de ejecución utilizado fue HBSP +0,05 % BSA+ 3 mM EDTA. Todo el mantenimiento del instrumento y el cebado de la línea de suministro de líquido se realizó de acuerdo con las instrucciones de operación del fabricante.

Tabla 19.

Resultados de unión de SPR:

Anticuerpos (CD33 x $\delta 2$)	K _D de afinidad (M)
GD33B273	$1,75 \times 10^{-8}$
GD33B112	$9,37 \times 10^{-10}$
GD33B116	$2,76 \times 10^{-10}$
GD33B139	$2,24 \times 10^{-9}$

EJEMPLO 8: CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE UNIÓN CELULAR

5 DE CD33 PARA ANTICUERPOS DE CD33 X $\delta 2$ BIESPECÍFICOS MEDIANTE
TINCIÓN FLUORESCENTE Y ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Materiales y métodos para la unión celular de CD33:

Para los experimentos de unión celular de CD33, se utilizaron placas de 96 pocillos junto con un instrumento de citometría de flujo Intellicyt iQue de Sartorius.com. Las

10 células se cultivaron, recogieron, y se tiñeron en regulador de tinción (número de catálogo BD 554657) complementado con un anticuerpo secundario, ya sea IgG antihumana de cabra Alexa-Fluor 647 de Jackson Immuno Research (jacksonimmuno.com) o anticamélido de conejo Alexa-Fluor 647 de Genscript (Genscript.com), para detectar las moléculas de prueba de anticuerpos. Para permitir

15 la activación en células vivas, las células se tiñeron previamente con tinte vivo/muerto de IR cercano (número de catálogo de Thermofisher L10119). Las moléculas de prueba se incubaron con células a 37 °C durante 1 hora, tras lo cual las células se lavaron mediante centrifugación y después se suspendieron en regulador de tinción.

Posteriormente se introdujo un anticuerpo secundario de detección, las muestras se incubaron durante 30 minutos, se lavaron, se suspendieron nuevamente, y finalmente, se analizaron las muestras en el instrumento iQue para cuantificar la tinción fluorescente.

- 5 Resultados del análisis de unión celular de CD33. La unión de GD33B273, GD33B112, GD33B116, y GD33B139 a células cancerosas CD33 positivas THP-1, así como a la línea celular desactivada THP-1 CD33 negativa para CD33, se detalla en las Figuras 4A-4D. Todas las moléculas exhibieron una unión específica a células WT THP-1 positivas para CD33 mientras que no demostraban unión a las células con inactivación
- 10 de CD33. La Figura 4E representa la unión celular de GD33B273 a una línea celular isogénica THP-1_C2 que expresa específicamente el dominio IgC2 de CD33.

EJEMPLO 9: EFICACIA DE LOS ANTICUERPOS DE CD33 X V δ 2 BIESPECÍFICOS EN PRESENCIA DE sCD33

- 15 Para mitigar además el impacto potencial de sCD33 en la eficacia del anticuerpo biespecífico, CD33 recombinante humano (rCD33; sec. con núm. de ident.: 9) se utilizó ECD como sustituto de sCD33. Se usó un ensayo de citotoxicidad de células T donde se incubaron células THP-1 y células pan-T con cantidades crecientes de proteína rCD33 antes de la adición de un rango de dosis del anticuerpo biespecífico
- 20 de CD33 X V δ 2 (cf. p. ej., ejemplo 3). El valor promedio de citotoxicidad de las células EC50 en ausencia de rCD33 fue 0,002 nM (promediado a partir de n=5 donantes de células T). La presencia de 5, 10, 25, 50, o 100 ng/ml de proteína rCD33 dio como resultado valores promedio comparables de EC50 de 0,001, 0,002, 0,001, 0,001, y

0,001 nM, respectivamente (Figura 5A y 5C). De igual manera, la adición de rCD33 no afectó la activación específica de las células T Vδ2 (Figura 5B y 5D). En resumen, la adición de ECD de rCD33 a concentraciones fisiológicas (~13,04 ng/ml) o altas no tuvo ningún impacto en la eficacia ni en la activación de células T del anticuerpo
 5 biespecífico en el ensayo de citotoxicidad de células T.

EJEMPLO 10: EVALUACIÓN NO TUMORAL EN LA DIANA DE LOS ANTICUERPOS DE CD33 X Vδ2 BIESPECÍFICOS

10 Anticuerpos CD33 X Vδ2 biespecíficos (*cf. p. ej.*, ejemplo 3) se evaluaron además en ensayos de citotoxicidad de PBMC con cocultivo MOLM-13 para evaluar la citotoxicidad de células cancerosas frente a monocitos sanos y células NK. Se observó citotoxicidad celular cancerosa preferencial similar con GD33B134 biespecífico y GD33B273 biespecífico con valores de EC₅₀ de citotoxicidad promedio comparables
 15 de 0,004 nM (IC de 95 % = 0,003-0,02 nM) y 0,008 nM (IC de 95 % = 0,0004-0,02 nM), respectivamente (Figura 7A). No se observaron efectos significativos sobre monocitos sanos y células NK con ambos anticuerpos (Figura 7B y Figura 7C). Si bien no se observó activación global de células T (Figura 7D), se detectó una activación similar de células T Vδ2 con GD33B134 biespecífico y GD33B273 biespecífico (Figura 7E).

EJEMPLO 11: EL ANTICUERPO CD33 X Vδ2 BIESPECÍFICO MEDIA LA CITOTOXICIDAD SELECTIVA DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS CD33+

La Figura 8A, Figura 8B, Figura 8C, Figura 8D muestran cómo el anticuerpo de CD33xδ2
 5 biespecífico GD33B273 media la citotoxicidad selectiva de las células cancerosas
 CD33+ (MOLM-13 y THP-1) y la activación selectiva de las células T Vδ2 en
 comparación con el anticuerpo que carece del brazo CD33 (NullxVδ2, también conocido
 como GD33B73). Las células T de donantes sanos se evaluaron en ensayos de
 citotoxicidad y activación de células T con anticuerpos GD33B273 y NullxVδ2 y líneas
 10 celulares diana. Se determinó la citotoxicidad de células cancerosas para GD33B273 en
 ensayos basados en citometría de flujo a las 72 horas con MOLM-13 y THP-1 como
 células cancerosas diana (Figura 8A y 8C). El ensayo se realizó a una relación E:T
 relativa de 0,5:1. La activación de células T se analizó evaluando la expresión de CD25
 en células T Vδ2 (Figura 8B y 8D) y se midió después de 72 horas.

15 Las Figura 8E y 8F muestran cómo el anticuerpo de CD33xδ2 biespecífico GD33B273
 media la citotoxicidad selectiva de células THP-1_C2 que expresan el dominio IgC2 de
 CD33 (Figura 8E) y la activación selectiva de células T Vδ2 (Figura 8F) cuando se
 compara con el anticuerpo que carece del brazo CD33 (NullxVδ2, también conocido
 como GD33B73). Las Figura 8G y 8H muestran cómo el anticuerpo de CD33xδ2
 20 biespecífico GD33B273 no media la citotoxicidad selectiva de células OCI-Ly10/CD33
 negativas, es decir, que no expresa CD33 (Figura 8G), y no media o muestra una
 activación selectiva mínima de las células T Vδ2 (Figura 8H) en comparación con el
 anticuerpo que carece del brazo CD33 (NullxVδ2, también conocido como GD33B73).

Las células OCI-Ly10 son una línea celular derivada del ser humano y se usan como células cancerosas diana.

EJEMPLO 12: EFICACIA DEL ANTICUERPO CD33 X V δ 2 EN EL MODELO DE BLASTOS DE BM DE AML

Las células T de donantes sanos se probaron en ensayos de citotoxicidad de células T con GD33B273 y células de médula ósea (BM) derivadas de pacientes AML, realizados a una relación E:T relativa de 2:1. Se evaluó la citotoxicidad del blasto CD33+ durante 24 horas. DN, donante. Se observó que el anticuerpo CD33x δ 2 GD33B273 biespecífico induce una potente citotoxicidad de células BM de AML de todos los donantes analizados (Figura 10).

EJEMPLO 13: EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL ANTICUERPO CD33 X V δ 2 BIESPECÍFICO EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Se aislaron células T V δ 2+ sin exposición previa de PBMC donantes sanas y se usaron como efectores a una relación relativa E:T 1:1 con células HSPC CD34+ o células THP-1 como células diana en un ensayo de CFU. HSPC: células madre y progenitoras hematopoyéticas; CD, cúmulo de diferenciación; CFU: unidad de formación de colonias; E:T, efector a objetivo; PBMC, células mononucleares de sangre periférica. GD33B273 mostró bajo riesgo de toxicidad hematopoyética mientras que mostró citotoxicidad para THP-1 de células cancerosas en una forma de respuesta a la dosis. (Figura 11). Las HSPC CD34+ son células madre de

donantes sanos, y la presencia de colonias robustas supervivientes (barras gris claro) muestra que el anticuerpo no las impacta. En contraste, las colonias de células cancerosas THP-1 (barras negras) disminuyen la supervivencia en una relación dependiente de la dosis con la concentración de anticuerpos.

5

EJEMPLO 14: EFICACIA DE ANTICUERPOS CD33 x V δ 2 EN EL MODELO DE PREVENCIÓN MOLM-13

El efecto antitumoral del anticuerpo CD33 X V δ 2 biespecífico GD33B134 (*cf. p. ej.*, el ejemplo 3) se evaluó en un modelo tumoral de mezcla MOLM-13 profiláctico con células PAN-T expandidas o células T V δ 2 enriquecidas como células efectoras en ratones humanizados de células T. Se usaron ratones NSG hembra (es decir, diabéticos no obesos [NOD] con inmunodeficiencia combinada grave [scid] gamma o nNOD.Cg Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) para proporcionar un huésped adecuado para reconstituir un compartimento de células T CD3+ humano.

Los ratones se inocularon por vía subcutánea (SC) con una mezcla de 1×10^6 células AML MOLM-13 y 5×10^6 células PAN-T expandidas o $2,5 \times 10^6$ células T V δ 2 enriquecidas en Matrigel el Día 0. A los ratones humanizados con células T se les administró anticuerpo de bloque Fc (un anticuerpo comercial que se usa para bloquear el receptor Fc en células receptoras inmunitarias) e inmunoglobulina intravenosa (IVIg) por vía intraperitoneal (IP) al menos 30 minutos antes de la dosificación del anticuerpo biespecífico para corregir el ambiente de bajo Ig en ratones NSG. En la cohorte con células pan-T expandidas como células efectoras, los ratones NSG se aleatorizaron en

grupos de 8 animales y el tratamiento IP se inició el día 1 después de la implantación celular con anticuerpo biespecífico GD33B134 a 1, 3, y 10 mg/kg dos veces por semana para un total de 11 dosis. El tratamiento con anticuerpo biespecífico no afectó el peso corporal de los animales. No obstante, se observaron algunas respuestas alógenas en tumores MOLM-13 mezclados con células PAN-T retrasando el crecimiento tumoral. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) de xenoinjertos MOLM-13 SC se calculó el Día 35 después del implante del tumor, cuando dos tercios de los animales permanecieron en el estudio en todos los grupos. Se observó eficacia antitumoral estadísticamente significativa en tumores tratados con anticuerpo biespecífico a 1, 3 y 10 mg/kg resultando en un TGI del 99,2 %, 99,3 % y 91,2 % respectivamente, en comparación con los controles tratados con vehículo (Figura 12).

EJEMPLO 15: EFICACIA DE UN ANTICUERPO CD33 X V δ 2 EN EL MODELO DE REGRESIÓN MOLM-13

15

La eficacia antitumoral del anticuerpo biespecífico CD33 X V δ 2 GD33B134 (*cf. p. ej.,* ejemplo 3) se evaluó en un modelo de regresión MOLM-13 diseminado con células T V δ 2 enriquecidas como células efectoras en ratones humanizados (ratones NOG hembra). Se inyectaron a ratones hIL-15 NOG por vía intravenosa (IV) con 1×10^6 células AML MOLM-13 el Día 0. El día 3, se inyectaron IV células T V δ 2 enriquecidas $9,4 \times 10^6$ y después de 24 horas, a los ratones humanizados con células T se les administró un bloque Fc e IVIg al menos 30 minutos antes de la dosificación de anticuerpos biespecíficos. Los ratones se aleatorizaron en grupos de 8 animales y el

tratamiento IP con 1, 3, y 10 mg/kg de anticuerpo biespecífico se inició el día 4 después de la implantación celular dos veces por semana para un total de 8 dosis. El día 16 se administró por vía IV una segunda inyección de células T V δ 2 enriquecidas ($7,9 \times 10^6$). Los ratones fueron monitoreados para la supervivencia y la pérdida de peso corporal.

- 5 Se observó un aumento de la vida útil (ILS) estadísticamente significativo con el anticuerpo biespecífico GD33B134 a 1, 3 y 10 mg/kg resultando en 117,9 %, 112,8 % y 102,6 % ILS, respectivamente, en comparación con animales tratados con vehículo (DPBS) (Figura 13A). Se observó reducción en el peso corporal (alcanzando ~ 23 %) en todos los animales tratados tras la inyección de células T V δ 2. No obstante, no se
- 10 observaron otros signos clínicos y la pérdida de peso corporal se recuperó a los pocos días de la administración de células T V δ 2 (Figura 13B). hIL-15, interleucina-15 humana; NOG, diabético no obeso (NOD)/inmunodeficiencia combinada (scid) grave IL2rgamma(null); DPBS, solución salina regulada con fosfato de Dulbecco.

15 EJEMPLO 16: UN ANTICUERPO DE CD33 X V δ 2 MEDIA LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN EL MODELO MOLM-13 IN VIVO DISEMINADO

- La Figura 14A y la Figura 14B presentan la eficacia del anticuerpo de CD33x δ 2 biespecífico GD33B273 en un modelo de ratones de regresión MOLM-13. En esta
- 20 prueba, las células cancerosas MOLM-13 fueron etiquetadas con luciferasa. Estas células cancerosas MOLM-13 etiquetadas se implantaron el día 0 en los ratones NOG hIL-15. A los mismos ratones se les inyectó las células T el Día 3 y 16, y se les administró el anticuerpo a las dosis indicadas (0, 0,3 y 3 mg/kg) los días 4, 7, 10, 14, 17, 21 y 24 (el

periodo de dosificación está indicado por la barra sólida bajo el eje X, es decir, del día 4 al día 24 para ambas Figuras 14A y 14B). Los resultados se presentan como radiancia tumoral promedio (Figura 14A) y como porcentaje de supervivencia (Figura 14B). Los datos solo se muestran para el período durante el cual dos tercios de los animales aún
5 estaban vivos en un grupo. La Figura 14A muestra un aumento en la radiancia promedio para los ratones no tratados (0 mg/kg) en comparación con los ratones tratados con 0,3 y 3 mg/kg de anticuerpo. La Figura 14A también muestra 61 % y 54,9 % de inhibición del crecimiento tumoral en el día 17 para ratones tratados con anticuerpo a 0,3 y 3 mg/kg, respectivamente, en comparación con ratones no tratados (0 mg/kg). La Figura
10 14B muestra un aumento en la supervivencia de los ratones tratados con 0,3 y 3 mg/kg de anticuerpo cuando se compara con ratones no tratados (0 mg/kg). ILS, aumento de la vida útil; TGI: inhibición del crecimiento tumoral.