

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 890**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2019 PCT/IB2019/054182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2019 WO19224711**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2019 E 19737216 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024 EP 3802606**

54 Título: **Anticuerpos anti-cd33, anticuerpos biespecíficos anti-cd33/anti-cd3 y sus usos**

30 Prioridad:

24.05.2018 US 201862676123 P

29.03.2019 US 201962825846 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2025

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.00%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

DIEM, MICHAEL;
GAUDET, FRANCOIS;
MCD AID, RONAN y
NAIR-GUPTA, PRIYANKA

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 998 890 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-cd33, anticuerpos biespecíficos anti-cd33/anti-cd3 y sus usos

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a anticuerpos biespecíficos anti-CD33 y anti-CD3, ácidos nucleicos y vectores de expresión que codifican los anticuerpos, células recombinantes que contienen los vectores y composiciones que comprenden los anticuerpos. También se proporcionan métodos para fabricar los anticuerpos y anticuerpos para su uso en métodos

10 de tratamiento de enfermedades que incluyen el cáncer.

Antecedentes de la invención

La leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés) es una enfermedad genéticamente heterogénea caracterizada por la expansión clonal de las células leucémicas. A pesar de una mayor comprensión de la biología subyacente de la AML, el tratamiento estándar con quimioterapia citotóxica se ha mantenido prácticamente sin cambios durante las últimas décadas y la supervivencia general a los cinco años sigue siendo baja, siendo menor que 30 % (Burnett, Wetzler y Lowenberg, 2011; Cancer Genome Atlas Research y col., 2013). Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de nuevas terapias con mayor eficacia y menor toxicidad, que se dirijan idealmente a las células madre de la AML, ya que se cree que estas células son fundamentales en la patogénesis de la AML y se cree que su erradicación inadecuada mediante el tratamiento estándar contribuye a la alta incidencia de recaídas (Hope, Jin y Dick, 2004; Ishikawa y col., 2007). Aunque los anticuerpos terapéuticos dirigidos a las moléculas de la superficie celular han demostrado ser eficaces para el tratamiento de trastornos malignos tales como los linfomas y la leucemia linfoblástica aguda, así como de tumores sólidos (Hoelzer, 2013; Jackson y Chester, 2015), solo una terapia basada en anticuerpos está aprobada actualmente para la AML (Godwin, Gale y Walter, 2017).

CD33 es una glucoproteína transmembrana de un solo paso de 67 kD y es un miembro de la familia de las lectinas similares a las inmunoglobulinas (Siglecs) que se unen al ácido siálico. Si bien su función biológica exacta no está clara, en individuos normales, se considera principalmente que es un antígeno de diferenciación mieloide, con baja expresión en progenitores mieloides, neutrófilos y macrófagos, mientras que se expresa en gran medida en los monocitos y células dendríticas circulantes. Es importante destacar que CD33 se ha detectado en blastos y células madre leucémicas del 85-90 % de los pacientes que presentan AML. Curiosamente, la expresión de CD33 está restringida a las células hematopoyéticas (Paul, Taylor, Stansbury y McVicar, 2000; Ulyanova, Biasoli, Woodford-Thomas y Thomas, 1999), pero está ausente en las células madre hematopoyéticas normales (Andrews, Torok-Storb y Bernstein, 1983; Griffin, Linch, Sabbath, Larcom y Schlossman, 1984; Jilani y col., 2002). Estos hallazgos sugieren que CD33 es un objetivo adecuado para una terapia basada en anticuerpos en la AML.

La estructura de CD33 consiste en un dominio tipo Ig del conjunto V aminoterminal (codificado por el exón 2 de CD33) que media la unión al ácido siálico y un dominio similar a Ig del conjunto C2 (codificado por los exones 3 y 4) en su porción extracelular (Laszlo y col., 2016). El corte y empalme alternativo del ARN de CD33 puede conducir a una isoforma más corta que se expresa en la superficie celular, que carece de la V- pero conserva el dominio similar al Ig del conjunto C2 (Laszlo, Estey y Walter, 2014; Laszlo y col., 2016). La relevancia biológica de este proceso de empalme se desconoce en gran medida hasta que estudios recientes mostraron que un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) rs12459419 estaba presente en aproximadamente el 50 % de la población de AML y conducía a la omisión del exón 2 de CD33, lo que resulta en la eliminación del dominio V de CD33 (Lamba y col., 2017). Curiosamente, varias terapias basadas en anticuerpos contra CD33, incluido Mylotarg, el único anticuerpo aprobado para la AML, se unen y reconocen el dominio V de CD33. De hecho, el estudio mencionado anteriormente mostró que Mylotarg no tiene eficacia en pacientes que expresan el SNP y, por lo tanto, solo tuvo eficacia en aproximadamente el 50 % de la población con leucemia mieloide aguda (Lamba y col., 2017). Teniendo en cuenta los datos de Mylotarg, es razonable plantear la hipótesis de que los otros anticuerpos CD33 que se unen al cromosoma V también solo serán eficaces en un grupo limitado de pacientes con AML, específicamente en aquellos que no tienen la mutación rs12459419 del SNP.

De hecho, al estudiar el espacio clínico de CD33, otros anticuerpos anti-CD33 incluyen el AMG330 y el AMG673 de Amgen, el AMV564 de Amphivena, el IMGN779 de Immunogen, el BI836858 de Boehringer Ingelheim, el Actimab de Actinium Pharma y el SGN33A de Seattle Genetic. El AMG330 de Amgen es un BiTE de CD33xCD3 y se ha informado que "reconoce un epítipo lineal ubicado en el dominio del conjunto V de CD33 con la secuencia central IPYYDKN". (Friedrich y col., MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 13, n.º 6, 1 de junio de 2014, páginas 1549-1557). Dado que el AMG673 es la versión de prolongación de la semivida del BiTE CD33, se cree que se une al mismo epítipo que el BiTE. El AMV564 de Amphivena es un anticuerpo CD33/CD3 biespecífico tetravalente y, según la patente US9803029, el anticuerpo se une al dominio V de CD33. El inmunógeno IMGN779 es un anticuerpo CD33 (My9-6) conjugado con un agente alquilante del ADN y, según la figura 1 de la patente US9359442, el anticuerpo My9-6 marcado con ¹²⁵I compitió con el anticuerpo My9 por unirse a las células U-937 positivas para CD33. El anticuerpo My9 se une al dominio V de CD33 (Pérez-Oliva y col., 2011). En conjunto, la evidencia sugiere que IMGN779 se une al dominio V de CD33. El BI 836858 de Boehringer Ingelheim es un anticuerpo anti-CD33 diseñado con Fc que media la ADCC mediada por células NK y se une al dominio V de CD33 (Vasu y col., 2016). Además, Vasu y col. muestran

evidencia de mapear lintuzumab (HuM195) en el dominio V de CD33 junto con Malik y col. y Pérez-Oliva y col. (Malik y col., 2015; Pérez-Oliva y col., 2011). El anticuerpo HuM195 se encuentra actualmente en ensayos clínicos conjugados con actinio por Actinium pharma para fabricar Actimab. Seattle Genetics también ha conjugado el anticuerpo HuM195 con un agente de unión al ADN para producir el SGN33A; sin embargo, este medicamento está actualmente en espera debido a problemas de toxicidad. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD33 conocidos en la técnica se unen al dominio V de CD33.

Teniendo en cuenta estos datos, existe una necesidad médica crítica insatisfecha en lo que respecta a las terapias con anticuerpos basadas en CD33 para la AML y la necesidad de disponer de un anticuerpo que se una al dominio C2 de CD33 para el tratamiento de los cánceres que expresan CD33. Pérez-Oliva y col. describen el mapeo epitópico, la expresión y las modificaciones postraduccionales de dos isoformas de CD33 (CD33M y CD33m) en células humanas linfoides y mieloides (Glycobiology, volumen 21, número 6, junio de 2011, páginas 757-770). La patente WO 2016/201388 describe anticuerpos anti-CD33 y métodos de uso de los mismos.

Breve resumen de la invención

En un aspecto general, la invención se refiere a anticuerpos biespecíficos aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a CD33 y CD3, tal como se define en las reivindicaciones. En la invención, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen al dominio C2 de CD33. La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier referencia a otras formas de realización o aspectos de la invención tiene únicamente fines ilustrativos.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos biespecíficos anti-CD33/anti-CD3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden un anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3, que tienen la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 447, 448, 449, 567, 568 y 569, respectivamente;

y el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3, que tiene la secuencia polipeptídica de:

1) id. de sec. n.º: 342, 343, 344, 465, 466 y 467, respectivamente; o

2) id. de sec. n.º: 345, 346, 347, 468, 469 y 470, respectivamente.

En ciertos casos, el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica al menos un 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 292, o una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica al menos un 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 332; y el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica al menos 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 257 o 258, o una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica al menos 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 298 o 299.

En ciertos casos, el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:

a. una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 292, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 332; y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 257, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 298; o

b. una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 292, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 332; y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 258, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 299.

En ciertos casos, los anticuerpos biespecíficos anti-CD33/anti-CD3 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos inducen una citotoxicidad dependiente de las células T en las células que expresan CD33 *in vitro* con un valor de EC₅₀ menor que aproximadamente 1 nM.

En ciertos casos, los anticuerpos biespecíficos anti-CD33/anti-CD3 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son quiméricos, parcialmente humanizados o completamente humanizados.

5 También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención.

También se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención.

10 También se proporcionan células huésped que comprenden los vectores que comprenden los ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención.

En ciertos casos, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 También se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso en métodos de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite. En ciertas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico. El cáncer hematológico se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en una leucemia, un linfoma o un mieloma múltiple, pero sin limitarse a él. En ciertos casos, el cáncer hematológico puede ser leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS, por sus siglas en inglés) riesgo bajo o alto, leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), incluidos 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 de células dendríticas plasmacitoides blásticas (DPDCN, por sus siglas en inglés).

25 También se proporcionan métodos para producir el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención. Los métodos comprenden cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión al antígeno en condiciones para producir el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión al antígeno, y recuperar el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno de la célula o cultivo.

30 También se proporcionan métodos para producir una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión al antígeno de la invención. Los métodos comprenden combinar el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

Breve descripción de las figuras

35 El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la de las realizaciones preferidas de la presente solicitud, se entenderán mejor cuando se leen junto con los dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que la solicitud no se limita a las realizaciones precisas mostradas en los dibujos.

40 Las figuras 1A-1B muestran ensayos de citotoxicidad mediados por células T CD33xCD3. Los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 usando el CD3B219 del brazo anti-CD3 se incubaron con células pan-T humanas y una línea celular de AML CD33⁺. Después de 48 h a 37 °C, 5 % de CO₂, se midió la citotoxicidad total de las células tumorales mediante citometría de flujo. La figura 1A muestra los anticuerpos candidatos identificados por OMNIRat y la figura 1B muestra los anticuerpos candidatos identificados por OMNIMouse.

45 Las figuras 2A-2B muestran la evaluación *ex vivo* de los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 usando la citotoxicidad de los blastocitos CD3B219 y CD3B376 del grupo anti-CD3 de los blastos y la activación de las células T en sangre entera fresco de un paciente con AML. La figura 2A muestra el porcentaje de citotoxicidad celular total de las células de AML usando anticuerpos biespecíficos CD33 o los controles CD3xnull. La figura 2B muestra la activación de las células T inducida por los anticuerpos biespecíficos CD33 o los controles CD3xnull. No se añadió ningún bloqueador de Fc.

50 Las figuras 3A-3C muestran ensayos de citotoxicidad mediados por células T CD33xCD3. Los anticuerpos biespecíficos de CD33xCD3 que utilizan CD3B219 y anti-CD3B376 del brazo anti-CD3 se incubaron con células T pan humanas y líneas celulares de AML que son de tipo silvestre (KG1, figura 3A), heterocigotas (SH2, figura 3B) u homocigotas (OCIAML3, figura 3C) para la mutación rs12459419 del SNP de CD33. Después de 48 h a 37 °C, 5 % de CO₂, se midió la citotoxicidad total de las células tumorales mediante citometría de flujo.

55 Las figuras 4A-4B muestran la evaluación *ex vivo* de los anticuerpos C33B904 emparejados con CD3B219 o CD3B376 sobre la citotoxicidad de las células MOLM-13 añadidas de forma exógena a sangre entera humana sana normal (N = 6 donantes): Porcentaje de citotoxicidad de las células MOLM-13 (figura 4A) y los monocitos CD33⁺CD14⁺ (figura 4B) usando los controles biespecíficos de CD33xCD3 y los respectivos controles de nullxCD3 a las 48 h.

60 Las figuras 5A-5B muestran la evaluación *ex vivo* de los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 usando CD3B219 y CD3B376 del grupo anti-CD3 sobre la citotoxicidad de los monocitos y la activación de las células T en sangre entera fresca de seis donantes de monos cynomolgus normales. La figura 5A muestra el porcentaje de citotoxicidad celular total de monocitos de cynomolgus CD33⁺CD14⁺ usando anticuerpos biespecíficos CD33 o sus controles CD3xnull. La

figura 5B muestra la activación de células T inducida por anticuerpos biespecíficos CD33 o sus controles CD3xnull. No se añadió ningún bloqueador de Fc.

La figura 6 muestra la eficacia antitumoral del C3CB189 en xenoinjertos de AML humana con MOLM-13 en ratones NSG humanizados con células T. Se tomaron imágenes de los tumores de MOLM-13 diseminados para determinar su bioluminiscencia (BLI) dos veces por semana y los resultados se presentaron como radiancia promedio (p/s/cm²/sr) $\pm$ SEM (n = 8-10/grupo). *p $\leq$ 0,0001 para el tratamiento vs. control, calculado mediante un ANOVA bidireccional con la prueba de Bonferroni.

La figura 7 muestra la supervivencia de animales tratados con C3CB189 en xenoinjertos de AML humana con MOLM-13 en ratones NSG humanizados con células T. La supervivencia de los ratones portadores de MOLM-13 se representa gráficamente usando una curva de Kaplan-Meier y se evalúa mediante la prueba Log-rank (Mantel-Cox). *p $\leq$ 0,0001 para los grupos de tratamiento vs. control.

La figura 8 muestra la eficacia antitumoral del C3CB88 en xenoinjertos de AML humana con MOLM-13 en ratones NSG humanizados con células T. Se tomaron imágenes de los tumores de MOLM-13 diseminados para determinar su bioluminiscencia (BLI) dos veces por semana y los resultados se presentaron como radiancia promedio (p/s/cm²/sr) $\pm$ SEM (n = 8-10/grupo). *p $\leq$ 0,0001 para el tratamiento vs. control, calculado mediante un ANOVA bidireccional con la prueba de Bonferroni.

La figura 9 muestra la supervivencia de animales tratados con C3CB88 en xenoinjertos de AML humana con MOLM-13 en ratones NSG humanizados con células T. La supervivencia de los ratones portadores de MOLM-13 se representa gráficamente usando una curva de Kaplan-Meier y se evalúa mediante la prueba Log-rank (Mantel-Cox). *p $\leq$ 0,05 para los grupos de tratamiento vs control.

La figura 10 muestra un ensayo de viabilidad celular conjugado con la proteína A *in vitro* para la detección de la internalización de cinco anticuerpos anti-CD33 en células MOLM13. Los cinco anticuerpos anti-CD33 mostraron citotoxicidad de una manera dependiente de la dosis.

Las figuras 11A-11B muestran que los mAAb anti-CD33 de IgG1 con bajo contenido de fucosa median la actividad de la ADCC. La ADCC de las células NK humanas contra las células diana de MOLM-13 (figura 11A) y MV4-11 (figura 11B) en respuesta al aumento de las concentraciones de los mAAb IgG1 anti-CD33.

La figura 12 muestra que las líneas celulares CD33 positivas y CD33 negativas se tiñeron durante 4 h con diversas concentraciones de C3 CB189 para caracterizar los perfiles de unión a la superficie del anticuerpo biespecífico.

La figura 13 muestra que las células T de seis donantes sanos se probaron en ensayos de redirección de células T con las líneas celulares indicadas y el porcentaje de citotoxicidad se determinó mediante FACS. Se representa gráficamente la media $\pm$ SD.

Figuras 14A y 14B. El C3CB189 se une al dominio C2 y media en la citotoxicidad de las muestras primarias independientemente de su estado de genotipo SNP 12459419. Figura 14A) Ensayos de citotoxicidad y activación mediados por células T usando anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 o CD123xCD3 en líneas celulares CD33⁺ KG-1 y CD33⁺ KG1ΔCD33. Figura 14B) Las células T solas se incubaron con concentraciones crecientes de C3CB189 durante 48 horas y la activación de las células T se midió mediante citometría de flujo. Se representa gráficamente la media $\pm$ SD.

Figuras 15A-15C. La figura 15A muestra la mediana de los valores que muestran EC₂₀, la EC₅₀ y la EC₉₀ para la lectura de citotoxicidad de seis donantes sanos. La figura 15B es similar a la figura 13, pero aquí se midió la activación de las células T. La figura 15C es similar a la figura 15A, pero aquí se muestran los valores de EC₂₀, EC₅₀ y EC₉₀ de mediana para la lectura de activación de células T de seis donantes sanos.

Figuras 16A-16E: El C3CB189 media la potente actividad tumoral *in vivo* en dos modelos de AML murina establecidos. La figura 16A muestra que a ratones NSG humanizados con células T que portaban tumores KG-1 establecidos se les administró por vía intravenosa C3CB189 a 0,1, 0,5 y 1 mg/kg. El volumen del tumor se midió dos veces por semana y los resultados se presentaron como el volumen tumoral medio $\pm$ SEM para cada grupo. La figura 16B muestra que a ratones NSG humanizados con células T que portaban células MOLM-13luc diseminadas se les administró por vía intravenosa C3CB189 a 0,005, 0,05 y 0,5 mg/kg. La supervivencia se determinó usando el análisis de supervivencia de Kaplan Meier. La figura 16C es la misma que la figura 16B, pero aquí se midió la bioluminiscencia dos veces por semana y se muestran imágenes representativas de imágenes de bioluminiscencia en animales vivos (vistas ventrales y dorsales de n = 3-5 animales) los días 9, 13 y 16 (n = 3 en el grupo de control el día 16 debido a la mortalidad). La figura 16D es similar a la figura 16B, pero aquí a los ratones se les administró C3CB189 a 0,005 y 0,05 mg/kg durante tres dosis. La infiltración de células T en la médula ósea se midió mediante análisis de citometría de flujo y los resultados se presentan como porcentaje de células tumorales (panel superior) o porcentaje de células T CD3⁺ (panel inferior). La figura 16E es la misma que la figura 16D, pero aquí la infiltración de células T en la médula ósea se midió mediante tinción IHC y los resultados se presentan como células tumorales CD33⁺ (panel superior) o células T CD8⁺ (panel inferior).

La figura 17 muestra que el C3CB189 media las respuestas antitumorales en un modelo de AML murina diseminada. Las células tumorales se implantaron el día 0, las células T se implantaron el día 5 y la dosificación se produjo como se indica mediante una barra por debajo del eje X. La bioluminiscencia grupal se representa gráficamente como la media $\pm$ SEM. * indica una diferencia significativa el día 13 ($p \leq 0,05$) entre el tratamiento con C3CB189 y el control con nullxCD3 ($n = 9-10$ /grupo el día 13).

Las figuras 18A y 18B muestran la citotoxicidad dependiente de células T inducida por C3CB189 de líneas celulares CD33⁺ en sangre entera. La figura 18A muestra que las células T de diez donantes sanos (punto único por donante) se probaron en ensayos de redirección de células T con las líneas celulares indicadas. Se representa gráficamente la media $\pm$ SD. La figura 18B es la misma que la figura 18A, pero aquí se muestran los valores de EC₂₀, EC₅₀ y EC₉₀ de citotoxicidad y activación de células T. ND indica que no se pudo determinar, es decir, que Prism proporcionó un valor aproximado o que la curva era ambigua. Los valores son las medianas de 10 donantes sanos.

Las figuras 19A y 19B muestran que el C3CB189 media en la citotoxicidad de los blastocitos de AML de muestras de pacientes primarios. La figura 19A muestra la evaluación *ex vivo* de la citotoxicidad mediada por C3CB189 de los blastos CD33⁺ en sangre entera fresca de un paciente con AML después de 48 h. Se muestran los valores individuales de EC₅₀ para cada muestra de paciente. La figura 19B es la misma que la figura 19A, pero aquí se midió la activación de las células T.

La figura 20 muestra que CD33 se expresa en subconjuntos inmunes de monos cynomolgus. La sangre entera de seis donantes sanos y normales de monos cynomolgus se tiñó con un anticuerpo monoclonal contra CD33 y se analizó mediante citometría de flujo. Se representa gráficamente la media $\pm$ SD.

La figura 21 muestra que el C3CB189 media en la citotoxicidad de las células MOLM-13, los monocitos de cynomolgus CD33⁺ normales y los neutrófilos, junto con la activación de células T de cynomolgus. Evaluación *ex vivo* de la citotoxicidad mediada por C3CB189 en células MOLM-13 de la línea celular AML añadidas exógenamente a sangre entera de monos cynomolgus sanos y normales ($n = 6$). Se muestra el porcentaje de citotoxicidad de las células MOLM-13, la activación de las células T y la citotoxicidad de los monocitos y neutrófilos CD33⁺ usando los anticuerpos biespecíficos C3CB189 y nullxCD3. Se representa gráficamente la media $\pm$ SEM.

Las figuras 22A-22D muestran que el C3CB189 media en la reducción de los leucocitos CD33⁺ en monos cynomolgus. Los monos cynomolgus se trataron con una única dosis intravenosa de control (vehículo), 0,05, 0,2 o 1 mg/kg de C3CB189. La figura 22A muestra los perfiles de concentración de C3CB189 a lo largo del tiempo. La figura 22B muestra la activación de células T (% de CD25⁺ en CD8⁺) en sangre periférica. La figura 22C muestra el efecto del C3CB189 sobre los granulocitos (neutrófilos). La figura 22D muestra el efecto del C3CB189 sobre los monocitos.

La figura 23 muestra la liberación de citocinas después de la dosificación de C3CB189 en monos cynomolgus. Niveles medios (SD) de citocinas en monos cynomolgus tras una dosis intravenosa única de C3CB189. (A) IFN γ , (B) IL-10, (C) IL-2, (D) IL-6, (E) MCP, (F) TNF α . Todos los valores de LLOQ inferiores se trataron como la mitad del LLOQ para fines de representación gráfica y cálculo de la media.

Las figuras 24A-24C muestran que C3CB189 se une al dominio C2 y media en la citotoxicidad de las muestras primarias independientemente de su estado de genotipo SNP 12459419. La figura 24A muestra el mapeo de HDX y la posterior ilustración de las regiones epitópicas en los dominios IgC e IgV de la proteína CD33 ECD para los mAb que se unen a V y C2. La región del epítipo V está coloreada en azul y la región del epítipo C2 está coloreada en rojo. La figura 24B muestra la evaluación *ex vivo* de la citotoxicidad de los blastos CD33⁺ en sangre entera fresca de paciente con AML se realizó a 27 nM de concentración de anticuerpos biespecíficos. Se representa gráficamente la media $\pm$ SD. La figura 24C muestra que la citotoxicidad mediada por C3CB189 de monocitos purificados congelados de 25 donantes normales se evaluó a 0,27 nM de concentración de anticuerpos biespecíficos. Se representa gráficamente la media $\pm$ SD.

Las figuras 25A-25C muestran los resultados de genotipado para el SNP rs12459419. La figura 25A muestra los resultados de genotipado de los ensayos de Taqman para el SNP rs12459419 en líneas celulares. La figura 25B es la misma que la figura 25A, pero en este caso se genotiparon muestras de pacientes primarios. La figura 25C es la misma que la figura 25A, pero aquí los monocitos congelados de donantes sanos se genotiparon usando ensayos de Taqman y secuenciación de Sanger.

Descripción detallada de la invención

Se citan o describen diversas publicaciones, artículos y patentes en los antecedentes y en toda la memoria descriptiva. La discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva es con el fin de proporcionar el contexto para la invención. Tal discusión no es una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos forman parte de la técnica anterior con respecto a cualesquier invenciones descritas o reivindicadas.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. De

cualquier otra manera, ciertos términos usados en la presente memoria tienen los significados que se establecen en la memoria descriptiva.

Debe observarse que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno/una” y “el/la” incluyen una referencia plural salvo que el contexto indique claramente de cualquier otra manera.

Salvo que se indique lo contrario, cualquier valor numérico, tal como una concentración o un intervalo de concentración descrito en la presente memoria, debe entenderse modificado en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por lo tanto, un valor numérico normalmente incluye el $\pm 10\%$ del valor citado. Por ejemplo, una concentración de 1 mg/ml incluye de 0,9 mg/ml a 1,1 mg/ml. Del mismo modo, un intervalo de concentración del 1 % al 10 % (p/v) incluye del 0,9 % (p/v) al 11 % (p/v). Como se usa en la presente memoria, el uso de un rango numérico incluye expresamente todos los subrangos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de ese rango, incluidos los números enteros dentro de dichos rangos y las fracciones de los valores, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que el término “al menos” que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritos en la presente memoria. Se pretende que dichos equivalentes estén abarcados por la invención.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “tiene”, “que tiene”, “contiene” o “que contiene”, o cualquier otra variación de los mismos, se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros determinado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros y se pretende que no sean exclusivos o de composición abierta. Por ejemplo, una composición, una mezcla, un proceso, un método, un artículo o un aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente solo a esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicha composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario, “o” se refiere a un o inclusivo y no a un o exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B se cumple con cualquiera de las siguientes condiciones: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o presente), y tanto A como B son verdaderos (o están presentes).

Tal como se usa en la presente memoria, se entiende que el término conjunto “y/o” entre los múltiples elementos citados abarca tanto las opciones individuales como las combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por “y/o”, una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y segundo elementos juntos. Se entiende que una cualquiera de estas opciones está dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término “y/o” tal como se usa en la presente memoria. También se entiende que la aplicabilidad simultánea de más de una de las opciones entra dentro del significado y, por lo tanto, cumple con el requisito del término “y/o”.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “consiste en” o variaciones tales como “consiste en” o “que consiste en”, tal como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros citado, pero que no se puede añadir ningún número entero o grupo de números enteros adicional al método, estructura o composición especificados.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “consiste esencialmente en”, o variaciones tales como “consiste esencialmente en” o “que consiste esencialmente en”, tal como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros mencionado, y la inclusión opcional de cualquier número entero o grupo de números enteros mencionado que no cambie materialmente las propiedades básicas o novedosas del método, estructura o composición especificados. Véase M.P.E.P. § 2111,03.

Tal como se usa en la presente memoria, “sujeto” significa cualquier animal, preferiblemente un mamífero, con la máxima preferencia un ser humano. El término “mamífero”, tal como se usa en la presente memoria, abarca cualquier mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, cobayas, monos, seres humanos, etc., más preferiblemente un ser humano.

También debe entenderse que los términos “aproximadamente”, “generalmente”, “sustancialmente” y términos similares, utilizados en la presente memoria cuando se refieren a una dimensión o característica de un componente de la invención preferida, indican que la dimensión/característica descrita no es un límite o parámetro estricto y no excluye variaciones menores del mismo que sean funcionalmente iguales o similares, como entenderá un experto en la técnica. Como mínimo, las referencias que incluyen un parámetro numérico incluirían variaciones que, usando los principios matemáticos e industriales aceptados en la técnica (p. ej., redondeo, medición u otros errores sistemáticos, tolerancias de fabricación, etc.), no variarían ni el dígito menos significativo.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas (p. ej., anticuerpos anti-CD33 y polinucleótidos que los codifican, anticuerpos biespecíficos anti-CD33 anti-CD3 y polinucleótidos que los codifican, polipéptidos CD33 y polinucleótidos CD33 que los codifican), se refieren

a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia, medidos usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

5 Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba en
10 relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) por el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase, en general, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

20 Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo
25 implica identificar primero los pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabras del vecindario (Altschul y col., *supra*). Estas primeras búsquedas de palabras en el vecindario actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. A continuación, los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulada.

Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa) para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización por residuos que no coincidan; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de la palabra aciertos en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada cae en una cantidad X con respecto a su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada pasa a cero o es inferior, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El
40 programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

45 Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (*ver, p. ej.*, Karlin & Altschul, Proc. Nacional. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similaridad proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reacciona inmunológicamente de forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es normalmente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos se diferencian solo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación.

60 Anticuerpos

La invención se refiere a anticuerpos biespecíficos anti-CD33/anti-CD3 aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos tal como se definen en las reivindicaciones, a ácidos nucleicos y vectores de expresión que codifican los anticuerpos, a células recombinantes que contienen los vectores y a composiciones que comprenden los anticuerpos biespecíficos. También se proporcionan métodos para fabricar los anticuerpos y anticuerpos para su uso en métodos

de tratamiento de enfermedades que incluyen el cáncer. Los anticuerpos de la invención poseen una o más propiedades funcionales deseables, que incluyen, pero no se limitan a, la unión de alta afinidad a CD33 y/o CD3, alta especificidad a CD33 y/o CD3 y la capacidad de tratar o prevenir el cáncer cuando se administran solos o en combinación con otras terapias contra el cáncer.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” se usa en un sentido amplio e incluye moléculas de inmunoglobulina o anticuerpos que incluyen anticuerpos humanos, humanizados, compuestos y quiméricos y fragmentos de anticuerpos que son monoclonales o policlonales. En general, los anticuerpos son proteínas o cadenas peptídicas que muestran especificidad de unión a un antígeno específico. Las estructuras de los anticuerpos son bien conocidas. Las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales (es decir, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. La IgA y la IgG se subclasifican además como los isotipos IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquiera de las cinco clases principales o subclases correspondientes. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las cadenas ligeras de anticuerpos de especies de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, especialmente kappa y lambda, basadas en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden contener un dominio constante de cadena ligera kappa o lambda. Según realizaciones particulares, los anticuerpos de la invención incluyen regiones constantes de cadena pesada y/o ligera de anticuerpos humanos o de ratas. Además de los dominios constantes pesados y ligeros, los anticuerpos contienen una región de unión al antígeno que está formada por una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, cada una de las cuales contiene tres dominios (es decir, las regiones 1-3 determinantes de complementariedad; CDR1, CDR2 y CDR3). Los dominios de la región variable de cadena ligera se denominan alternativamente LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y los dominios de la región variable de cadena pesada se denominan alternativamente HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD33 está sustancialmente libre de anticuerpos que no se unen al CD33). Además, un anticuerpo aislado está sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales de la descripción pueden prepararse mediante el método del hibridoma, la tecnología de presentación en fagos, la tecnología de clonación de genes de linfocitos individuales o mediante métodos de ADN recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, tal como un ratón o una rata transgénicos, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera.

Como se usa en la presente memoria, el término “fragmento de unión a antígeno” se refiere a un fragmento de anticuerpo tal como, por ejemplo, un diacuerpo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂, un dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un dsFv biespecífico estabilizado con disulfuro diacuerpo (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo monocatenario (scFv), un anticuerpo de dominio único (sdab), un dímero scFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo multiespecífico formado a partir de una porción de un anticuerpo que comprende una o más CDR, un anticuerpo de dominio único camelizado, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de dominio bivalente, o cualquier otro fragmento de anticuerpo que se una a un antígeno pero que no comprenda una estructura de anticuerpo completa. Un fragmento de unión al antígeno es capaz de unirse al mismo antígeno al que se une el anticuerpo original o un fragmento de anticuerpo original. Según realizaciones particulares, el fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera, una región constante de cadena ligera y un segmento Fd de cadena pesada. Según otras realizaciones particulares, el fragmento de unión al antígeno comprende Fab y F(ab').

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo monocatenario” se refiere a un anticuerpo monocatenario convencional en el campo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera conectadas por un péptido corto de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 aminoácidos. Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo de un solo dominio” se refiere a un anticuerpo de un solo dominio convencional en el campo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada o que comprende solo una región variable de cadena pesada.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo producido por un ser humano o a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano fabricado usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humana.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo no humano que se modifica para aumentar la homología de secuencia con la de un anticuerpo humano, de tal modo que se conservan las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo, pero se reduce su antigenicidad en el cuerpo humano.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. La región variable de las cadenas ligera y pesada a menudo corresponde a la región variable de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero (p. ej., ratón, rata, conejo, etc.) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes corresponden a las secuencias de un anticuerpo derivado de otra especie de mamífero (p. ej., un ser humano) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.

Como se usa en la presente memoria, 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 epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, el primer y el segundo epítopos están en el mismo antígeno, p. ej., la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una realización, el primer y segundo epítopos se superponen o se superponen sustancialmente. En una realización, el primer y segundo epítopos no se superponen o no se superponen sustancialmente. En un ejemplo, el primer y segundo epítopos están en antígenos diferentes, p. ej., en las diferentes proteínas (o en las diferentes subunidades de una proteína multimérica). En una realización, un anticuerpo multiespecífico comprende un tercer, cuarto o quinto dominio variable de inmunoglobulina. En un ejemplo, un anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífica, una molécula de anticuerpo trispecífica o una molécula de anticuerpo tetraespecífica.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo biespecífico” se refiere a un anticuerpo multiespecífico que se une a no más de dos epítopos 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 epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. El primer y el segundo epítopos pueden estar en el mismo antígeno, p. ej., la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). El primer y segundo epítopos pueden superponerse o superponerse sustancialmente. El primer y segundo epítopos pueden estar en antígenos diferentes, p. ej., las diferentes proteínas (o diferentes subunidades de una proteína multimérica). En un ejemplo, un anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítipo y una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, un anticuerpo biespecífico comprende medio anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y medio anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, un anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo, y un scFv, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, el primer epítipo se localiza en CD33 y el segundo epítipo se localiza en CD3.

Como se usa en la presente memoria, el término “CD33” se refiere a una glucoproteína transmembrana de un solo paso de 67 kD, que es un miembro de la familia de las lectinas de tipo inmunoglobulina (Siglecs) que se unen al ácido siálico. CD33 también se conoce como Siglec-3, gp67 o p67. La estructura de CD33 consiste en un dominio tipo Ig del conjunto V aminoterminal (codificado por el exón 2 de CD33) que media la unión al ácido siálico y un dominio similar al Ig del conjunto C2 (codificado por el exón 4) en su porción extracelular (Laszlo y col., 2016). El corte y empalme alternativo del ARN de CD33 puede conducir a una isoforma más corta que se expresa en la superficie celular, que carece de la V pero conserva el dominio similar al Ig establecido en C2 (Laszlo, Estey y Walter, 2014; Laszlo y col., 2016). La relevancia biológica de este proceso de empalme se desconocía en gran medida hasta que estudios recientes mostraron que un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) rs12459419 estaba presente en aproximadamente el 50 % de la población de AML y conducía a la omisión del exón 2 de CD33, lo que resulta en la eliminación del dominio V de CD33 (Lamba y col., 2017). CD33 de humano de longitud completa lo proporciona Uniprot P20138 (Id. de sec. n.º: 1).

Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que “se une específicamente a CD33” se refiere a un anticuerpo que se une a un CD33, preferiblemente un CD33 de humano, preferiblemente el dominio C2 de CD33, con una KD de 1×10^{-7} M o menos, preferiblemente 1×10^{-8} M o menos, más preferiblemente 5×10^{-9} M o menos, 1×10^{-9} M o menos, 5×10^{-10} M o menos, o 1×10^{-10} M o menos. El término “KD” se refiere a la constante de disociación, que se obtiene de la relación de Kd a Ka (es decir, Kd/Ka) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para anticuerpos pueden determinarse mediante el uso de métodos en la técnica en vista de la presente descripción. Por ejemplo, la KD de un anticuerpo se puede determinar usando resonancia de plasmón superficial, tal como usando un sistema de biosensor, p. ej., un sistema Biacore®, o usando tecnología de interferometría de biocapa, tal como un sistema Octet RED96.

Cuanto menor sea el valor de la KD de un anticuerpo, mayor será la afinidad de unión del anticuerpo a un antígeno diana.

También se proporcionan en la presente memoria anticuerpos biespecíficos anti-CD33/anti-CD3 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que comprenden un anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo, tal como se define en las reivindicaciones. En la invención, el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención y el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3, que tiene secuencia polipeptídica de (1) id. de sec. n.º: 342, 343, 344, 465, 466 y 467, respectivamente, o (2) id. de sec. n.º: 345, 346, 347, 468, 469 y 470, respectivamente.

El término "CD3" se refiere al complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3. CD3 también puede denominarse "grupo de diferenciación 3". El complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3 está compuesto por seis (6) cadenas polipeptídicas distintivas, que incluyen una cadena CD3 γ (SwissProt P09693) (Id. de sec. n.º: 588), una cadena CD3 δ (SwissProt P04234) (Id. de sec. n.º: 589), dos cadenas CD3 ϵ (SwissProt P07766) (Id. de sec. n.º: 590) y un homodímero de cadena CD3 ζ (SwissProt 20963) (Id. de sec. n.º: 591), que está asociado con la cadena α y β del receptor de las células T. CD3 es un correceptor de células T que funciona para activar tanto las células T citotóxicas (células T sin CD8+) como las células T auxiliares (células T sin CD4+). Las cadenas polipeptídicas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ del complejo de múltiples subunidades CD3 se asocian con el receptor de células T (TCR) y la cadena CD3 ζ para generar una señal de activación en los linfocitos T, y la interacción entre CD3 y el receptor de células T constituye el complejo TCR. El término "CD3" incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie de CD3 que se exprese de forma natural en las células (incluidas las células T) o que pueda expresarse en células transfectadas con genes o ADNc que codifican esos polipéptidos, a menos que se indique, preferiblemente el "CD3" es un complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3 de humano. La redirección de los linfocitos T a las células cancerosas que expresan CD33 a través del complejo TCR/CD3 representa un enfoque de tratamiento alternativo atractivo. El complejo TCR/CD3 de los linfocitos T consiste en un heterodímero TCR alfa (α)/beta (β) o TCR gamma (γ)/delta (δ) coexpresado en la superficie celular con las subunidades invariantes de CD3 etiquetadas gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ), y eta (η). CD3 ϵ de humano se describe en UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Un anticuerpo anti CD3 ϵ descrito en el estado de la técnica es el SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137: 1097-1100), que reacciona tanto con CD3 de primates como con de humano y está disponible comercialmente en Pharmingen. Los anticuerpos anti-CD3 adicionales descritos en el estado de la técnica incluyen UCHT-1 (véase la patente WO2000041474) y BC-3 (Instituto de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson; usado en ensayos de fase I/II sobre la gvHD, Anasetti y col., Transplantation 54: 844 (1992)). El SP34 difiere del UCHT-1 y el BC-3 en que el SP-34 reconoce un epítipo presente únicamente en la cadena α del CD3 (véase Salmeron y col., (1991) J. Immunol. 147: 3047) mientras que el UCHT-1 y el BC-3 reconocen un epítipo aportado por las cadenas ϵ y γ . Las secuencias de anticuerpos con la misma secuencia que SP34 se describen al menos en los documentos WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 y WO2010037838. En la patente US8236308 (WO2007042261) se describe una secuencia de anticuerpos que es idéntica en un 96 % a la SP34 VH.

Se han descrito diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos y fueron revisados recientemente por Chames y Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276.

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un anticuerpo cruzado o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio controlado de brazos Fab como los descritos en la presente invención.

En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos incluyen moléculas de tipo IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; moléculas de doble direccionamiento tipo IgG recombinantes, en donde cada uno de los dos lados de la molécula contiene el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; moléculas de fusión de IgG, en donde los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan con un fragmento Fab adicional o partes de un fragmento Fab; moléculas de fusión Fc, en donde las moléculas Fv monocatenarias o los diacuerpos estabilizados se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas; moléculas de fusión Fab, en donde diferentes fragmentos Fab se fusionan entre sí; Anticuerpos de cadena pesada y basados en scFv y diabobios (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) en donde diferentes moléculas Fv monocatenarias o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o con otra proteína o molécula portadora.

En algunos casos, las moléculas similares a la IgG con dominios CH3 complementarios incluyen el Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), las Knobs-into-Holes (Genentech), los CrossMabs (Roche) y los emparejados electrostáticamente (Amgen), el LUZ-Y (Genentech), el cuerpo de dominio diseñado por intercambio de cadenas (SeedBody) (EMD Serono), el Biclonic (Merus) y DuoBody (Genmab A/S).

En algunos casos, las moléculas de doble direccionamiento recombinantes de tipo IgG incluyen el anticuerpo de doble objetivo (DT) -Ig (GSK/Domantis), el anticuerpo dos en uno (Genentech), los mAb reticulados (Karmanos Cancer Center), el mAb2 (F-Star) y el cuerpo COVX (COVX/Pfizer).

En algunos casos, las moléculas de fusión de IgG incluyen el dominio variable dual (DVD)-Ig (Abbott), las biespecíficas de tipo IgG (InnClone/ELI Lilly), el Ts2Ab (MedImmune/AZ) y el BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TVAb (Roche).

- 5 En algunos casos, las moléculas de fusión Fc incluyen fusiones scFv/Fc (institución académica), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (FC-DART) (macrogenics) y Dual (scFv).sub.2-FAB (National Research Center for Antibody Medicine--China).

- 10 En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos de fusión Fab incluyen F (ab) 2 (Medarex/AmGen), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecol) y Fab-Fv (UCB-Celltech). Los anticuerpos scFv, basados en diabobios y de dominio incluyen, entre otros, el enganche de células T biespecíficas (BiTE) (Micromet), el diacuerpo en tándem (Tandab) (Affimed), la tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (DART) (MacroGenics), el diacuerpo monocatenario (académica), los anticuerpos similares al TCR (AIT, ReceptorLogics), la fusión de albúmina sérica humana (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de doble objetivo (Ablynx), anticuerpos de dominio único de cadena pesada de doble objetivo.

- 20 Los anticuerpos biespecíficos de longitud completa de la invención pueden generarse, por ejemplo, mediante el intercambio de brazos Fab (o intercambio de medias moléculas) entre dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos mediante la introducción de sustituciones en la interfaz CH3 de cadena pesada en cada semimolécula para favorecer la formación de heterodímeros de dos semimoléculas de anticuerpos que tienen una especificidad distinta, ya sea in vitro en un entorno libre de células o mediante la coexpresión. La reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro y disociación-asociación de los dominios CH3. Los enlaces disulfuro de cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos monoespecíficos originales se reducen. Las cisteínas libres resultantes de uno de los anticuerpos monoespecíficos originales forman un enlace disulfuro entre cadenas pesadas con los residuos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y, simultáneamente, los dominios CH3 de los anticuerpos originales se liberan y se reforman por disociación-asociación. Los dominios CH3 de los brazos Fab pueden modificarse por ingeniería genética para favorecer la heterodimerización frente a la homodimerización. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab o semimoléculas, cada uno de los cuales se une a un epítipo distinto, es decir, un epítipo en CD33 y un epítipo en CD3.

- 30 La "homodimerización", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos CH3 idénticas. El término "homodímero", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos CH3 idénticas.

- 35 La "heterodimerización", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos de CH3 no idénticas. El término "heterodímero", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos de CH3 no idénticas.

- 40 La estrategia de "perilla en orificio" (véase, p. ej., PCT publicación de patente internacional n.º WO 2006/028936) se puede usar para generar anticuerpos biespecíficos de longitud completa. En resumen, los aminoácidos seleccionados que forman la interfaz de los dominios CH3 en la IgG humana pueden mutarse en posiciones que afectan a las interacciones del dominio CH3 para promover la formación de heterodímeros. Se introduce un aminoácido con una cadena lateral pequeña (orificio) en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno y un aminoácido con una cadena lateral grande (perilla) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno. Tras la coexpresión de los dos anticuerpos, se forma un heterodímero como resultado de la interacción preferencial de cadena pesada con un "orificio" con la cadena pesada con una "perilla". Los pares de sustitución de CH3 ejemplares que forman una perilla y un orificio son (expresados como 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.

- 50 Se pueden usar otras estrategias, tales como promover la heterodimerización de cadena pesada mediante interacciones electrostáticas sustituyendo 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 n.º US2010/0015133; publicación de patente n.º US2009/0182127; publicación de patente n.º US2010/028637, o la publicación de patente n.º US2011/0123532. En otras estrategias, la heterodimerización puede promoverse mediante las siguientes sustituciones (expresadas como 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, T366L_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 publicación de patente n.º US-2012/0149876 y la publicación de patente n.º US-2013/0195849.

- 65 Además de los métodos descritos anteriormente, los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden generarse in vitro en un entorno libre de células introduciendo mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos y formando el anticuerpo heterodimérico biespecífico a partir de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos originales en condiciones reductoras para permitir la isomerización de enlaces disulfuro

según los métodos descritos en la publicación de patente internacional n.º WO2011/131746. En los métodos, el primer anticuerpo bivalente mono-específico (p. ej., el anticuerpo anti-CD33) y el segundo anticuerpo bivalente mono-específico (p. ej., el anticuerpo anti-CD3) se modifican por ingeniería genética para tener ciertas sustituciones en el dominio CH3 que promueven la estabilidad de los heterodímeros; los anticuerpos se incuban juntos en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas de la región bisagra sufran una isomerización de enlaces disulfuro; generando así el anticuerpo biespecífico mediante el intercambio de brazos Fab. Las condiciones de incubación pueden restaurarse de manera óptima a condiciones no reductoras. Los ejemplos de agentes reductores que pueden usarse son la 2-mercaptoetilamina (2-MEA), el ditiotretol (DTT), el ditioeritritol (DTE), el glutatión, la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), la L-cisteína y el beta-mercaptoetanol, preferiblemente un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditiotretol y tris(2-carboxietil)fosfina. Por ejemplo, se puede usar la incubación durante al menos 90 minutos 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 ditiotretol a un pH de 5-8, por ejemplo a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3, que tiene la secuencia polipeptídica de las id. de sec. n.º: 447, 448, 449, 567, 568 y 569, respectivamente,

y el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3, que tiene la secuencia polipeptídica de:

1) id. de sec. n.º: 342, 343, 344, 465, 466 y 467, respectivamente; o

2) id. de sec. n.º: 345, 346, 347, 468, 469 y 470, respectivamente.

En ciertos casos, el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica de al menos un 85 %, preferiblemente un 90 %, más preferiblemente un 95 % o más, tal como un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una de las id. de sec. n.º: 259-296, o una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica de al menos un 85 %, preferiblemente un 90 %, más preferiblemente un 95 % o más, tal como un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o idéntica en un 99 % a una de las id. de sec. n.º: 300-338; y el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica de al menos un 85 %, preferiblemente un 90 %, más preferiblemente un 95 % o más, tal como un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la id. de sec. n.º: 257 o 258, o una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de polipéptidos de al menos un 85 %, preferiblemente un 90 %, más preferiblemente un 95 % o más, tal como un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a id. de sec. n.º: 298 o 299.

En ciertos casos, el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:

a. una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 292, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 332; y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 257, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 298; o

b. una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de la id. de sec. n.º: 260, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia polipeptídica de la id. de sec. n.º: 301; y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 257, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 298;

En algunos casos descritos en la presente memoria, las propiedades efectoras inmunitarias de los anticuerpos específicos de CD33 pueden mejorarse o silenciarse mediante modificaciones de Fc mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las funciones efectoras del Fc son la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP), la regulación negativa de los receptores de la superficie celular (p. ej., el receptor de células B; BCR), etc. pueden proporcionarse y/o controlarse modificando los residuos en el Fc responsables de estas actividades.

La "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc (FcR) (p. ej., las células destructoras naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, provocan la lisis de la célula diana.

La capacidad de los anticuerpos monoclonales para inducir la ADCC se puede mejorar modificando su componente oligosacárido. La IgG1 o la IgG3 humanas están N-glicosiladas en Asn297 con la mayoría de los glicanos en las conocidas

formas biantenarias G0, G0F, G1, G1F, G2 o G2F. Los anticuerpos producidos por células CHO no modificadas por ingeniería genética tienen normalmente un contenido de glicano fucosa de aproximadamente al menos el 85 %. La eliminación de la fucosa central de los oligosacáridos de tipo complejo biantenario unidos a las regiones Fc mejora la ADCC de los anticuerpos al mejorar la unión al Fc. γ . RIIa sin alterar la unión al antígeno o la actividad de los CDC. Dichos mAb se pueden lograr usando diferentes métodos que, según se informa, conducen a la expresión exitosa de anticuerpos defucosilados relativamente altos que portan oligosacáridos de Fc de tipo complejo biantenario, como el control de la osmolalidad del cultivo (Konno y col., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), la aplicación de una variante de la línea CHO Lec13 como línea celular huésped (Shields y col., *J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), la aplicación de una variante de la línea CHO EB66 como línea celular hospedadora (Olivier y col., *MAbs*; 2(4), 2010; Publicación electrónica antes de la impresión; PMID:20562582), aplicación de una línea celular de hibridoma de rata YB2/O como línea celular huésped (Shinkawa y col., *J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), introducción de pequeños ARN interferentes específicamente contra el gen de la α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (Mori y col., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004), o la coexpresión de la β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III y la α -manosidasa II de Golgi o un potente inhibidor de la alfa-manosidasa I, la kifunensina (Ferrara y col., *J Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara y col., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Zhou y col., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

En algunos casos descritos en la presente memoria, la ADCC provocada por los anticuerpos CD33 también puede mejorarse mediante ciertas sustituciones en el anticuerpo Fc. Las sustituciones ejemplares son, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones de aminoácidos 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 o 430 (numeración de residuos según el índice de la UE) tal como se describe en la patente n°. US-6.737.056.

Según otro aspecto particular, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico aislado anti-CD33/anti-CD3 o a un fragmento de unión al antígeno del mismo capaz de inducir citotoxicidad dependiente de las células T en las células que expresan CD33. El anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo puede, por ejemplo, inducir una citotoxicidad dependiente de las células T en las células que expresan CD33 *in vitro* con un valor de EC₅₀ menor que aproximadamente 2 nM. En ciertas realizaciones, la EC₅₀ es menor que aproximadamente 2,0 nM, menor que aproximadamente 1,9 nM, menor que aproximadamente 1,8 nM, menor que aproximadamente 1,7 nM, menor que aproximadamente 1,6 nM, menor que aproximadamente 1,5 nM, menor que aproximadamente 1,4 nM, menor que aproximadamente 1,3 nM, menor que aproximadamente 1,2 nM, menor que aproximadamente 1,1 nM, menor que aproximadamente 1,0 nM, menor que aproximadamente 0,9 nM, menor que aproximadamente 0,8 nM, menor que aproximadamente 0,7 nM, menor que aproximadamente 0,6 nM, menor que aproximadamente 0,5 nM, menor que aproximadamente 0,4 nM, menor que aproximadamente 0,3 nM, menor que aproximadamente 0,2 nM e menor que aproximadamente 0,1 nM.

Según otro aspecto particular, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 aislado o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo es quimérico.

Según otro aspecto particular, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 aislado o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo es humano o humanizado.

En otro aspecto general, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que la secuencia codificante de una proteína se puede cambiar (p. ej., reemplazar, eliminar, insertar, etc.) sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Por consiguiente, los expertos en la técnica entenderán que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden alterarse sin cambiar las secuencias de aminoácidos de las proteínas.

En otro aspecto general, la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención. Se puede usar cualquier vector conocido por los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción, tal como un plásmido, un cósmido, un vector fágico o un vector viral. En algunos casos, el vector es un vector de expresión recombinante, tal como un plásmido. El vector puede incluir cualquier elemento para establecer una función convencional de un vector de expresión, por ejemplo, un promotor, un elemento de unión al ribosoma, un terminador, un potenciador, un marcador de selección y un origen de replicación. El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o reprimible. En la técnica se conocen varios vectores de expresión capaces de administrar ácidos nucleicos a una célula y pueden usarse en la presente memoria para la producción de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al antígeno en la célula. Se pueden usar técnicas de clonación convencionales o síntesis génica artificial para generar un vector de expresión recombinante según las realizaciones de la invención. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

En otro aspecto general, la invención se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención. Cualquier célula huésped conocida por los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción puede usarse para la expresión recombinante de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención. En algunos casos, las

células huéspedes son células TG1 o BL21 de *E. coli* (para la expresión de, p. ej., un anticuerpo scFv o Fab), células CHO-DG44 o CHO-K1 o células HEK293 (para la expresión de, p. ej., un anticuerpo IgG de longitud completa). Según realizaciones particulares, el vector de expresión recombinante se transforma en células hospedadoras mediante métodos convencionales tales como la transfección química, el choque térmico o la electroporación, donde se integra de manera estable en el genoma de la célula huésped de manera que el ácido nucleico recombinante se exprese eficazmente.

En otro aspecto general, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, que comprende cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo en condiciones para producir un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la célula o cultivo celular (p. ej., del sobrenadante). Los anticuerpos expresados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden recogerse de las células y purificarse según las técnicas convencionales conocidas en la técnica y tal como se describe en la presente memoria.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto general, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El término “composición farmacéutica”, tal como se usa en la presente memoria, significa un producto que comprende un anticuerpo de la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos de la invención y las composiciones que los comprenden también son útiles en la fabricación de un medicamento para las aplicaciones terapéuticas mencionadas en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término “portador” se refiere a cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, regulador, estabilizador, solubilizante, aceite, lípido, vesícula que contiene lípidos, microesfera, encapsulación liposomal u otro material bien conocido en la técnica para su uso 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 memoria, el término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de una composición según la invención o la actividad biológica de una composición según la invención. Según realizaciones particulares, en vista de la presente descripción, puede usarse cualquier portador farmacéuticamente aceptable adecuado para su uso en una composición farmacéutica de anticuerpo en la presente invención.

La formulación de ingredientes farmacéuticamente activos con portadores farmacéuticamente aceptables es conocida en la técnica, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (p. ej., 21a edición (2005) y cualquier edición posterior). Los ejemplos no limitativos de ingredientes adicionales incluyen: reguladores, diluyentes, disolventes, agentes reguladores de la tonicidad, conservantes, estabilizantes y agentes quelantes. Se pueden usar uno o más portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación de las composiciones farmacéuticas de la invención.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica es una formulación líquida. Un ejemplo preferido de una formulación líquida es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. La formulación líquida puede comprender una solución, una suspensión, una emulsión, una microemulsión, un gel y similares. Una formulación acuosa normalmente comprende al menos el 50 % p/p de agua, o al menos el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 % o al menos el 95 % p/p de agua.

En un ejemplo, la composición farmacéutica se puede formular como un inyectable que se puede inyectar, por ejemplo, mediante un dispositivo de inyección (p. ej., una jeringa o una bomba de infusión). La inyección puede administrarse por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravítrea o intravenosa, por ejemplo.

En otra realización, la composición farmacéutica es una formulación sólida, p. ej., una composición liofilizada o secada por pulverización, que se puede usar tal cual, o a la que el médico o el paciente añaden disolventes y/o diluyentes antes de su uso. Las formas de dosificación sólidas pueden incluir comprimidos, tales como comprimidos comprimidos y/o comprimidos recubiertos, y cápsulas (p. ej., cápsulas de gelatina dura o blanda). La composición farmacéutica también puede estar en forma de sobres, grageas, polvos, gránulos, pastillas o polvos para la reconstitución, por ejemplo.

Las formas de dosificación pueden ser de liberación inmediata, en cuyo caso pueden comprender un portador soluble o dispersable en agua, o pueden ser de liberación retardada, liberación sostenida o liberación modificada, en cuyo caso pueden comprender polímeros insolubles en agua que regulan la velocidad de disolución de la forma de dosificación en el tracto gastrointestinal o debajo de la piel.

En otros casos, la composición farmacéutica puede administrarse por vía intranasal, intrabucal o sublingual.

El pH en una formulación acuosa puede estar entre pH 3 y pH 10. En una realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,5. En otra realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un regulador. Los ejemplos no limitativos de reguladores incluyen: arginina, ácido aspártico, bicina, citrato, hidrogenofosfato disódico, ácido fumárico, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, ácido maleico, ácido málico, acetato de sodio, carbonato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, fosfato de sodio, succinato, ácido tartárico, tricina y tris (hidroximetil) -aminometano, y mezclas de los mismos. El regulador puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos reguladores específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un conservante. Los ejemplos no limitantes de reguladores incluyen: cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, bronopol, 4-hidroxibenzoato de butilo, clorobutanol, clorocresol, clorohexidina, clorfenesina, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 4-hidroxibenzoato de etilo, imidurea, 4-hidroxibenzoato de metilo, fenol, 2-fenoxietanol, 4-hidroxibenzoato de propilo, deshidroacetato de sodio, tiomerosal y mezclas de los mismos. El conservante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos conservantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un agente isotónico. Los ejemplos no limitativos de la invención incluyen una sal (tal como cloruro de sodio), un aminoácido (tal como glicina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano y treonina), un alditol (tal como glicerol, 1,2-propanodiol, propilenglicol), 1,3-propanodiol y 1,3-butanodiol), polietileno, lenglicol (p. ej., PEG400) y mezclas de los mismos. Otro ejemplo de un agente isotónico incluye un azúcar. Los ejemplos no limitativos de azúcares pueden ser mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta-HPCD, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa sódica. Otro ejemplo de un agente isotónico es un alcohol de azúcar, en donde el término "alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo C (4-8) que tiene al menos un grupo -OH. Los ejemplos no limitantes de alcoholes de azúcar incluyen manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada agente isotónico enumerado en este párrafo constituyen realizaciones alternativas de la invención. El agente isotónico puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un agente quelante. Los ejemplos no limitantes de agentes quelantes incluyen ácido cítrico, ácido aspártico, sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos agentes quelantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un estabilizador. Los ejemplos no limitantes de estabilizantes incluyen uno o más inhibidores de la agregación, uno o más inhibidores de la oxidación, uno o más surfactantes y/o uno o más inhibidores de proteasas.

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un estabilizador, en donde dicho estabilizador es carboxi/hidroxixelulosa y sus derivados (tales como HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, 2-metiltoetanol, polietilenglicol (tal como PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, sales (tales como cloruro de sodio), azufre que contienen sustancias tales como monotioglicerol) o ácido tioglicólico. El estabilizador puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos estabilizantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En otras realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende uno o más surfactantes, preferiblemente un surfactante, al menos un surfactante o dos surfactantes diferentes. El término "surfactante" se refiere a cualquier molécula o ion que esté compuesto por una parte soluble en agua (hidrófila) y una parte soluble en grasa (lipófila). El surfactante puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en surfactantes aniónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes no iónicos y/o surfactantes zwitteriónicos. El surfactante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos surfactantes específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

En una realización adicional de la invención, la composición farmacéutica comprende uno o más inhibidores de proteasas, tales como, p. ej., EDTA y/o ácido clorhídrico de benzamida (HCl). El inhibidor de proteasa puede estar

presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos inhibidores de proteasa específicos constituyen realizaciones alternativas de la invención.

- 5 En otro aspecto general, la invención se refiere a un método para producir una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, que comprende combinar un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

10 Métodos de uso

En otro aspecto general, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o a un fragmento de unión al antígeno del mismo o a una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método para atacar CD33 en la superficie de una célula cancerosa en un sujeto.

- 15 También se contempla en la presente memoria un inmunoconjugado terapéutico de anticuerpos anti-CD33 que comprende un agente terapéutico que se selecciona del grupo que consiste en átomos de radionúclido, boro, gadolinio o uranio, un inmunomodulador, tal como una citocina, un factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, tal como el factor de necrosis tumoral (TNF), un factor hematopoyético tal como una interleucina (IL), un factor estimulante de colonias (LCR) tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), un interferón (IFN) tal como los interferones α , $-\beta$ o $-\gamma$, y un factor de crecimiento de células madre tal como el denominado "factor S1", un factor hematopoyético, eritropoyetina, trombotopoyetina, un anticuerpo, una hormona, un antagonista hormonal, una enzima, un inhibidor enzimático, un agente terapéutico fotoactivo, un fármaco citotóxico, tales como agentes antimetabólicos, agentes alquilantes, agentes antimetabolitos, agentes inhibidores de la angiogénesis, apoptóticos agentes, agentes alcaloides, agentes inhibidores de la COX-2 y agentes antibióticos, una toxina citotóxica, tal como toxinas vegetales, toxinas microbianas y toxinas animales, y variaciones sintéticas de las mismas, e inhibidor de la angiogénesis, un anticuerpo diferente y una combinación de los mismos. En una realización preferida, la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, interferón- γ , TNF- α y una combinación de los mismos, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en un emisor Auger, un emisor beta y un emisor alfa, tal como P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, y Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255, B-10, Gd-157, U-235 y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el radionúclido tiene una energía entre 20 y 10.000 keV.

- La actividad funcional de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a CD33 se puede caracterizar mediante métodos conocidos en la técnica y tal como se describe en la presente memoria. Los métodos para caracterizar los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a CD33 incluyen, pero no se limitan a, ensayos de afinidad y especificidad, incluidos los análisis de Biacore, ELISA y OctetRed; ensayos de unión para detectar la unión de anticuerpos a CD33 en células cancerosas mediante FACS. Según realizaciones particulares, los métodos para caracterizar los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen al CD33 incluyen los que se describen a continuación.

- 45 En otro aspecto general, la invención se refiere a una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento de un cáncer, en un sujeto que lo necesita. El cáncer puede ser, por ejemplo, un cáncer que expresa CD33. El cáncer puede seleccionarse, por ejemplo, entre un cáncer de pulmón, un cáncer gástrico, un cáncer de colon, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de células renales, un carcinoma urotelial de vejiga, un melanoma metastásico, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer de cuello uterino, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de páncreas, un glioma, un glioblastoma y otros tumores sólidos, y un linfoma no Hodgkin's (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), mieloma múltiple (MM), mieloide agudo leucemia (AML) y otros tumores líquidos. El cáncer puede ser, por ejemplo, un cáncer hematológico. El cáncer hematológico puede ser, por ejemplo, una leucemia, un linfoma y un mieloma. En ciertos casos, el cáncer hematológico puede ser leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS, por sus siglas en inglés) riesgo bajo o alto, leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), incluidos 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 de células dendríticas plasmacitoides blásticas (DPDCN, por sus siglas en inglés).

- Como se usa en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un ingrediente activo o componente que provoca la respuesta biológica o medicinal deseada en un sujeto. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede determinarse empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el propósito indicado.

- Como se usa en la presente memoria con referencia a los anticuerpos anti-CD33 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad del anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo que modula una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita.

Según realizaciones 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 aminorar la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección a tratarse o un síntoma asociado con los mismos; (ii) reducir la duración de la enfermedad, trastorno o afección a tratarse, o un síntoma asociado con los mismos; (iii) prevenir la progresión de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado con los mismos; (iv) causar la regresión de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado con los mismos; (v) prevenir el desarrollo o inicio de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado con los mismos; (vi) prevenir la recurrencia de la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado con los mismos; (vii) reducir la hospitalización de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno o afección que se va a tratar, o un síntoma asociado con los mismos; (viii) reducir la duración de la hospitalización de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno o afección que se va a tratar, o un síntoma asociado con los mismos; (ix) aumentar la supervivencia de un sujeto con la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado con los mismos; (xi) inhibir o reducir la enfermedad, trastorno o afección a tratar, o un síntoma asociado con el mismo en un sujeto; y/o (xii) potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia.

La cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz puede variar según diversos factores, tales como la enfermedad, trastorno o condición que se tratará, 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 de manera óptima para optimizar la seguridad y la eficacia.

Según realizaciones particulares, las composiciones descritas en la presente memoria se formulan para ser adecuadas para la vía de administración prevista para un sujeto. Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse para ser adecuadas para la administración intravenosa, subcutánea o intramuscular.

Como se usa en la presente memoria, los términos “tratar”, “tratado” 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 “tratar”, “tratando” y “tratamiento” también pueden referirse a causar regresión, prevenir la progresión, o al menos ralentizar la progresión de la enfermedad, trastorno, o afección. En una realización particular, “tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren a un alivio, prevención del desarrollo o inicio, o reducción en la duración de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o condición, tal como un tumor o más preferiblemente, un cáncer. En una realización particular, “tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren a la prevención de la recurrencia de la enfermedad, trastorno, o afección. En una realización particular, “tratar”, “tratar” y “tratamiento” se refieren a un aumento en la supervivencia de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno, o afección. En una realización particular, “tratar”, “tratar” y “tratamiento” se refieren a la eliminación de la enfermedad, trastorno o afección en el sujeto.

Según realizaciones particulares, se proporcionan composiciones usadas en el tratamiento de un cáncer. Para la terapia del cáncer, las composiciones se pueden usar en combinación con otro tratamiento que incluye, pero no se limita a, una quimioterapia, un mAb anti-CD20, un mAb anti-TIM-3, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-1, una terapia PD-1/PD-L1, otros fármacos inmunooncológicos, un agente antiangiogénico, una radioterapia, un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), una terapia dirigida u otros medicamentos contra el cáncer.

Como se usa en la presente memoria, el término “en combinación”, en el contexto de la administración de dos o más terapias a un sujeto, se refiere al uso de más de una terapia. El uso del término “en combinación” no restringe el orden en que las terapias se administran a un sujeto. Por ejemplo, una primera terapia (p. ej., una composición descrita en la presente memoria) puede administrarse antes (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 horas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes) concomitantemente con, o posterior a (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 horas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después), de la administración de una segunda terapia a un sujeto.

Ejemplos

Reactivos

Generación de antígenos

Las proteínas CD33 de humano y de cynomolgus se produjeron con o sin una forma monomérica mutada de albúmina sérica humana (HSA), Uniprot P02768 con una mutación C58S, fusionada en el extremo C para inmunizaciones y ensayos. Los ADNc que codifican los antígenos de la proteína CD33 con una etiqueta de seis histidinas se sintetizaron sintéticamente y se clonaron en un vector de expresión de secreción en mamíferos con el promotor de actina usando técnicas de biología molecular estándar.

El dominio extracelular CD33 (ECD) humano de longitud completa derivado de Uniprot P20138 (Id. de sec. n.º: 1) (CD33 ECD humano) se fusionó en el extremo N con una secuencia señal y con o sin la HSA, seguida de una etiqueta de seis histidinas en el extremo C, el hCD33 ECD con la HSA y el hCD33 ECD solo). El constructo de expresión de CD33 ECD de humano se transfectó transitoriamente en células derivadas de HEK293, Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) usando Expifectamina según el protocolo del fabricante. Las células se incubaron 5 días a 37 °C con un 8 % de CO₂ en un agitador orbital antes de la recolección. Las células expresadas se retiraron por centrifugación y CD33 soluble se purificó del medio usando cromatografía de afinidad por metales inmovilizados usando resina Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare); Little Chalfont, Reino Unido), seguida de la cromatografía preparativa de exclusión por tamaño (SEC) Superdex 200 (GE Healthcare) en el regulador de disolución salina de fosfato de Dubelcco a pH 7,2 (1 x DPBS). Las fracciones de elución SEC excluyendo cualquier agregado de disulfuro se combinaron y se filtraron de forma estéril para producir la proteína final para la inmunización y los ensayos de CD33. La concentración de proteína se determinó mediante A280 y la calidad de la proteína purificada se evaluó mediante SDS-PAGE y SEC analítica (Phenomenex; Torrance, California). Las mediciones de endotoxinas se realizaron usando cartuchos EndoSafe-PTS, un ensayo de LAL cromogénico (Charles River; Wilmington, Massachusetts).

Las proteínas del subdominio CD33 ECD humano, el dominio V de hCD33 HSA, el dominio V de hCD33 HIS, el dominio C2 de hCD33 HSA y el dominio C2 de HIS de hCD33, se construyeron, expresaron y purificaron similarmente al CD33 ECD humano de longitud completa.

También se generaron constructos de cynomolgus CD33 para ensayos de inmunización y selectividad cruzada, de cynomolgus CD33 ECD-HSA y cyno CD33-His, basado en la secuencia XP_005590138.1 de Genbank. La expresión y purificación de la proteína CD33 de cynomolgus fueron las mismas que las de las proteínas CD33 de humano.

Los antígenos CD33 para el cribado se biotinilaron en fosfato de Na 50 mM, pH 7,2, usando el kit de etiquetado de biotina cromógena SureLink (SeraCare KPL) según las condiciones del fabricante. En resumen, se añadió una reserva de biotina de 25 mM a la proteína CD33 en una proporción molar de biotina a proteína de 4:1 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con una rotación suave y después se cambió a 4 °C durante 2 horas más. La biotina no incorporada se retiró mediante intercambio de regulador en 1x DPBS. La concentración de proteína y la incorporación de biotina se determinaron midiendo a A280 nm y A354 nm usando NanoDrop. Véase la Tabla 1 para ver las secuencias de cada uno de los antígenos descritos anteriormente.

Tabla 1: Secuencias de antígenos

Nombre de la proteína	ID de proteína	Id. de sec. n.º
CD33 ECD-HSA de cynomolgus	C33W1	2
CD33 ECD-HSA de humano	C33W2	3
CD33-V-HSA de humano	C33W3	4
CD33-C2-HSA de humano	C33W4	5
CD33-V-His de humano	C33W8	6
CD33 C2-His de humano	C33W9	7
CD33 ECD-His humano	C33W49	8
CD33 ECD-His de cynomolgus	C33W50	9
Longitud completa de CD33 de humano		10
Longitud completa de CD33 de cynomolgus		11

Generación de líneas celulares isogénicas que expresan CD33

Las líneas celulares que expresan CD33 de humano y de cynomolgus se generaron usando lentivirus (Genecopoeia; Rockville, MD) que contiene CD33 de humano o de cynomolgus CD33 de longitud completa y puromicina para la selección de células CD33 positivas. Las células HEK293F (ATCC), negativas para CD33, se transdujeron con partículas lentivíricas para sobreexpresar CD33 de humano y CD33 de cynomolgus. Tras la transducción, las células que expresaban positivamente CD33 y el marcador de resistencia se seleccionaron mediante el tratamiento de células agrupadas, cultivadas en DMEM + FBS con un 10 % de HI (Life Technologies; Carlsbad, CA) y se complementa con concentraciones variables de puromicina (Life Technologies).

Además de las líneas celulares generadas por HEK, se usaron varias líneas celulares comerciales para los ensayos de unión y toxicidad celular. Estos incluían MOLM13, KG1, SH2, OCIAML3 y MV411 y se obtuvieron de la American Type Culture Collection o de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, y se cultivaron a 37 °C, con un 5 % de CO₂ en un medio de cultivo RPMI completo con un 10 % de FBS.

Ejemplo 1: Campañas de inmunización

OmniRat

Una cepa de rata transgénica con inmunoglobulina humana (OmniRat[®]; Ligand Pharmaceuticals; San Diego, CA) se usó para desarrollar células de hibridoma que expresan anticuerpos monoclonales CD33 de humano. La OmniRat[®] contiene un locus IgH quimérico humano/rata (que comprende 22 V_{HS} humanos, todos los segmentos D y J_H humanos en configuración natural enlazados al locus C_H de rata) junto con loci IgL completamente humanos (12 V_{KS} enlazados a J_K-C_K y 16 V_{LS} enlazados a J_L-C_L). (véase, p. ej., Osborn y col. (2013) J Immunol 190 (4): 1481-1490). Por consiguiente, las ratas muestran una expresión reducida de inmunoglobulina de rata y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos sufren un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG de humano/rata quiméricos de alta afinidad con regiones variables completamente humanas. La preparación y el uso de OmniRat[®], y las modificaciones genómicas portadas por dichas ratas, se describen en la publicación PCT WO 2014/093908 de Bruggemann y col.

Cuando se inmuniza con CD33 recombinante humano y de cynomolgus (huCD33 ECD-HSA y CD33 ECD-HSA de cynomolgus, respectivamente), esta rata transgénica produce anticuerpos IgG quiméricos humano-rata contra CD33 humano, algunos de los cuales también se unen a CD33 de cynomolgus.

Se inmunizaron ocho OmniRats alternativamente con huCD33 ECD-HSA y CD33 ECD-HSA de cynomolgus. Tras un régimen de inmunización de 46 días, se recogieron los ganglios linfáticos de las ocho OmniRats y se usaron para generar hibridomas. Se examinaron ochenta y una placas de 96 pocillos de sobrenadantes de hibridomas mediante ELISA de unión y AlphaLISA usando técnicas estándar, de las cuales se seleccionaron 128 sobrenadantes de hibridomas para su unión específica al huCD33 ECD-HSA y a CD33 ECD-HSA de cynomolgus. La mayoría de los 128 sobrenadantes también fueron positivos para unirse a células que sobreexpresaban huCD33 o cyCD33.

Se inmunizaron seis OmniRats adicionales solo con rhuCD33. Tras un régimen de inmunización de 31 días, se recogieron los ganglios linfáticos de las seis OmniRats y se usaron para generar hibridomas. Se examinaron treinta placas de 96 pocillos de sobrenadantes de hibridomas mediante ELISA de unión usando técnicas estándar, de las cuales se seleccionaron 94 sobrenadantes de hibridoma para su unión específica a huCD33 ECD-HSA y CD33 ECD-HSA de cynomolgus. Los lisados de hibridoma se prepararon a partir de los clones positivos y progresaron hasta la clonación de la región v descrita a continuación.

OmniMouse

Una cepa de ratón transgénica con inmunoglobulina humana (OmniMouse[®]; Ligand Pharmaceuticals) se usó para desarrollar células de hibridoma que expresan anticuerpos monoclonales CD33 de humano. OmniMouse[®] contiene loci de IgH quiméricos humanos/de rata junto con loci de IgL completamente humanos. Los ratones muestran una expresión reducida de la inmunoglobulina de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos sufren un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG de humano/rata quiméricos de alta afinidad con regiones variables completamente humanas.

Cuando se inmuniza con CD33 recombinante humano y de cynomolgus (huCD33 ECD-HSA y CD33 ECD-HAS de cynomolgus, respectivamente), este ratón transgénico produce anticuerpos IgG quiméricos humanos/de rata contra CD33 humano, algunos de los cuales también se unen a CD33 de cynomolgus.

Cuatro ratones OmniMouse se inmunizaron alternativamente con huCD33 ECD-HSA y CD33 ECD-HSA de cynomolgus. Tras un régimen de inmunización de 53 días, se extrajeron los bazo y los ganglios linfáticos de los cuatro ratones OmniMouse y se usaron para generar hibridomas. Se examinaron cuarenta y ocho placas de 96 pocillos de sobrenadantes de hibridomas mediante ELISA de unión y AlphaLISA, de las cuales se seleccionaron 8 sobrenadantes de hibridoma para su unión específica al huCD33 ECD-HSA y a CD33 ECD-HSA de cynomolgus. Los lisados de hibridoma se prepararon a partir de los clones positivos y progresaron hasta la clonación de la región v descrita a continuación.

Clonación de la región V

El ARN total de los lisados de células de hibridoma se purificó usando el kit RNeasy 96 (Qiagen; Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante, y el ARN resultante se cuantificó usando Drop Sense y se almacenó a -80 °C o el ADNc se sintetizó usando el sistema de síntesis de primera cadena Invitrogen SuperScript III para RT-PCR (Invitrogen; Carlsbad, California). La síntesis de ADNc de la primera cadena se llevó a cabo usando cebadores específicos de genes hibridados con las regiones constantes de las cadenas pesada, kappa y lambda, respectivamente. La mezcla de reacción de RT-PCR se compone de hasta 3 µg de ARN purificado, cebador específico para genes, mezcla de dNTP, regulador de reacción, MgCl₂ 25 mM, DTT, RNaseOut[™] (40 U/µl, Invitrogen) y SuperScript[™] III RT (200 U/µl, número de catálogo de Invitrogen 18080-051), y se incubó a 50 °C durante 50 minutos y 85 °C durante 5 minutos. El ADNc monocatenario resultante se almacenó a -20 °C, o el ADN monocatenario se

amplificó por PCR. La reacción de PCR se llevó a cabo usando polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen). Los fragmentos de la región V se amplificaron mediante cebadores directos e inversos que se hibridaron con las secuencias líder y las regiones constantes de las cadenas pesadas, kappa y lambda, respectivamente, usando condiciones de PCR optimizadas. Los fragmentos de PCR resultantes se procesaron en el gel y se secuenciaron en GENEWIZ usando cebadores prediseñados para obtener secuencias de la región V. Los archivos .abi resultantes de secuencias de la región V se recopilaron y analizaron mediante el programa de análisis de secuencias de la región V de Sanger creado en Janssen Biologics Discovery. Las secuencias AA de las regiones V recuperadas se registraron en la base de datos interna, se optimizaron los codones y se clonaron en el vector de expresión basado en Punder que portaba la región constante apropiada del isotipo de anticuerpo humano deseado: IgG1 F405L e IgG4 PAA. Se clonaron con éxito un total de 76 anticuerpos OmniRat y 8 anticuerpos OmniMouse y se procedió a su posterior caracterización. Las tablas siguientes resumen las secuencias de las 42 principales identificadas en las campañas OMNIRat (ver Tabla 2) y las 16 identificadas en la campaña OMNIMouse (ver Tabla 3) con varios de los anticuerpos OMNIRAT clonados en IgG1 e IgG4 PAA y todos los de la campaña OMNIMouse se clonaron en PAA IgG1 e IgG4.

Tabla 2: Secuencias de anticuerpos identificadas mediante inmunización con CD33 en OMNIRat

mAb	HC ID	Isotipo HC	Id. de sec. de proteína AA	Id. de sec. de nucleótido	LC ID	Id. de sec. de proteína AA	Id. de sec. de nucleótido
C33B46	C33H108	hulgG1F405L	12	54	C33L74	96	138
C33B48	C33H80	hulgG1F405L	13	55	C33L73	97	139
C33B52	C33H42	hulgG1F405L	14	56	C33L8	98	140
C33B54	C33H44	hulgG1F405L	15	57	C33L10	99	141
C33B55	C33H45	hulgG1F405L	16	58	C33L11	100	142
C33B56	C33H46	hulgG1F405L	17	59	IAPL24	101	143
C33B61	C33H48	hulgG1F405L	18	60	C33L58	102	144
C33B62	C33H49	hulgG1F405L	19	61	C33L59	103	145
C33B63	C33H51	hulgG1F405L	20	62	C33L34	104	146
C33B64	C33H52	hulgG1F405L	21	63	N46L109	105	147
C33B66	C33H55	hulgG1F405L	22	64	C33L42	106	148
C33B72	C33H65	hulgG1F405L	23	65	C33L47	107	149
C33B73	C33H66	hulgG1F405L	24	66	C33L60	108	150
C33B75	C33H70	hulgG1F405L	25	67	N46L109	109	151
C33B77	C33H72	hulgG1F405L	26	68	C33L40	110	152
C33B79	C33H74	hulgG1F405L	27	69	C33L38	111	153
C33B80	C33H76	hulgG1F405L	28	70	C33L39	112	154
C33B82	C33H78	hulgG1F405L	29	71	C33L57	113	155
C33B83	C33H81	hulgG1F405L	30	72	C33L53	114	156
C33B87	C33H87	hulgG1F405L	31	73	C33L35	115	157
C33B88	C33H88	hulgG1F405L	32	74	C33L61	116	158
C33B89	C33H90	hulgG1F405L	33	75	C33L51	117	159
C33B94	C33H98	hulgG1F405L	34	76	C33L69	118	160
C33B95	C33H98	hulgG1F405L	35	77	IAPL24	119	161
C33B96	C33H99	hulgG1F405L	36	78	C33L37	120	162
C33B101	C33H69	hulgG1F405L	37	79	C4LL152	121	163
C33B107	C33H68	hulgG1F405L	38	80	C33L17	122	164
C33B120	C33H87	hulgG1F405L	39	81	C33L41	123	165
C33B122	C33H92	hulgG1F405L	40	82	C33L30	124	166
C33B123	C33H91	hulgG1F405L	41	83	C33L44	125	167

mAb	HC ID	Isotipo HC	Id. de sec. de proteína AA	Id. de sec. de nucleótido	LC ID	Id. de sec. de proteína AA	Id. de sec. de nucleótido
C33B124	C33H73	hulG1F405L	42	84	C33L32	126	168
C33B125	C33H84	hulG1F405L	43	85	C33L66	127	169
C33B760	C33H45	hulG4 PAA	44	86	C33L11	128	170
C33B777	C33H65	hulG4 PAA	45	87	C33L47	129	171
C33B778	C33H66	hulG4 PAA	46	88	C33L60	130	172
C33B782	C33H72	hulG4 PAA	47	89	C33L40	131	173
C33B792	C33H87	hulG4 PAA	48	90	C33L35	132	174
C33B799	C33H98	hulG4 PAA	49	91	C33L69	133	175
C33B806	C33H69	hulG4 PAA	50	92	C4LL152	134	176
C33B830	C33H84	hulG4 PAA	51	93	C33L66	135	177
C33B836	C33H80	hulG4 PAA	52	94	C33L73	136	178
C33B937	C33H66	hulG4 PAA	53	95	C33L132	137	179
HC: Cadena pesada; LC: Cadena ligera							

Tabla 3: Secuencias de anticuerpos identificadas mediante inmunización con CD33 en OMNIMouse

mAb	HC ID	Id. de sec. n.º de proteína	Id. de sec. n.º de nucleótido	LC ID	Id. de sec. n.º de proteína	Id. de sec. n.º de nucleótido
C33B901	C33H249	180	196	C33L115	212	228
C33B902	C33H250	181	197	C33L116	213	229
C33B903	C33H251	182	198	C33L117	214	230
C33B904	C33H252	183	199	C33L118	215	231
C33B905	C33H253	184	200	C33L119	216	232
C33B906	C33H254	185	201	C33L120	217	233
C33B907	C33H255	186	202	C33L121	218	234
C33B908	C33H256	187	203	C33L122	219	235
C33B909	C33H249	188	204	C33L115	220	236
C33B910	C33H250	189	205	C33L116	221	237
C33B911	C33H251	190	206	C33L117	222	238
C33B912	C33H252	191	207	C33L118	223	239
C33B913	C33H253	192	208	C33L119	224	240
C33B914	C33H254	193	209	C33L120	225	241
C33B915	C33H255	194	210	C33L121	226	242
C33B916	C33H256	195	211	C33L122	227	243
HC: Cadena pesada; LC: Cadena ligera						

Transfección y purificación a pequeña escala de Expi293

Los anticuerpos identificados en las campañas de inmunización y la posterior clonación de la región V (en IgG1 F405L e IgG4 PAA) se expresaron y purificaron a través de una escala pequeña de 2 ml. Las células Expi293™ (ThermoFisher Scientific) se sembraron con una densidad de $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$ células viables/ml en el medio de expresión Expi293™ y se cultivaron en frascos de batido Erlenmeyer desechables, estériles, ventilados y sin deflectores en una incubadora con agitador Erlenmeyer a 37 °C y con un 7 % de CO₂ (INFORS HT Multitron Pro). Para el crecimiento celular rutinario en matraces con agitación de 125 ml a 2 litros, la velocidad de agitación se estableció en 130 rpm para

los agitadores con un diámetro de agitación de 19 mm. Las células se subcultivaron cuando la densidad alcanzó la fase logarítmica de crecimiento a 3×10^6 - 5×10^6 células viables/ml con una viabilidad del 98-99 %.

5 El día de la transfección, se determinaron la densidad celular viable y el porcentaje de viabilidad. Las células se transfectaron a una densidad de 3×10^6 células viables/ml. Para una transfección óptima, se usa ADN plasmídico de cadena pesada y ligera estéril a una concentración de 0,1 mg/ml en regulador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

10 Las células Expi293™ se transfectaron siguiendo el protocolo de transfección del fabricante (número de publicación de ThermoFisher MAN0007814). La transfección se realizó en placas de pozo profundo de 24 pocillos (GE Healthcare). En resumen, el ADN plasmídico se diluyó con 0,1 ml de medio OptiMem™ (ThermoFisher Scientific) en la siguiente proporción: 0,250 µg de ADN de cadena pesada: 0,750 µg de ADN de cadena ligera: 0,5 µg de pAdvantage. Se diluyeron 5 µl de reactivo de transfección ExpiFectamine™ 293 y se mezclaron suavemente con 95 µl de medio OptiMem™ y se incubaron durante 1 min. El reactivo ExpiFectamine™ 293 diluido se añadió al ADN diluido, se mezcló suavemente y los complejos de ADN plasmídico ExpiFectamine™ 293/ADN se incubaron a temperatura ambiente durante 40 minutos. Tras la incubación, se añadieron 1,8 ml de células Expi293™ a los complejos incubados durante la noche en una incubadora con agitador a 37 °C y 7 % de CO₂.

20 El día 1 después de la transfección, se añadieron 10 µl de potenciador 1 de Expifectamine™ 293 y 100 µL de potenciador 2 de Expifectamine 293™ y las placas se devolvieron a la incubadora durante 5 días adicionales. El cultivo se recolectó el día 6 después de la transfección mediante centrifugación a 850 x G durante 15 minutos antes de la purificación.

25 Se transfirieron 1,7 ml de sobrenadantes de expresión clarificados preparados anteriormente a una nueva placa Deepwell de 96 ml de 2 ml. Las placas de purificación se prepararon pipeteando 800 µl de una mezcla 1:4 de resina MaB Select Sure (GE Healthcare) y suspensión DPBS +/- en cada pocillo de una placa de filtro de vidrio Acroprep Advance de 1 µm de 96 pocillos (Pall). Se aplicaron 200 mbar de presión de vacío a la placa para eliminar el exceso de PBS y posteriormente se lavó con 800 µl de PBS fresco. Se aplicó una presión de vacío de 200 mbar para eliminar el regulador de lavado. Los sobrenadantes clarificados se transfirieron después a la resina lavada con PBS, se mezclaron suavemente y se incubaron durante 15 minutos. Tras la incubación, se aplicó una presión de vacío de 200 mbar para eliminar el sobrenadante. La resina MaB Select Sure se lavó tres veces con PBS y una vez con acetato de sodio 25 mM, pH 5 (TEKNOVA; Hollister, CA) con una presión de vacío de 200 mbar aplicada entre lavados para eliminar el exceso de regulador. Los mAb unidos a la resina se eluyeron con acetato de sodio 0,1 M, pH 3,5 y se incubaron durante 10 minutos para una disociación eficaz. La placa de filtro se colocó encima de una placa de 96 pocillos profundos y los mAb eluidos se recogieron en la placa inferior mediante centrifugación a 1000 g durante 2 minutos. Se añadieron 80 µl de tris-acetato 2,5 M, pH 7,2, para neutralizar los mAb. Los mAb se dializaron en PBS durante la noche en una placa DispoDIALYZER de 96 pocillos (Harvard Apparatus; Holliston, MA), transferida a una placa filtrante Acroprep Advance Supor de 0,2 µm de 96 pocillos (Pall; Port Washington, NY), se colocó sobre una placa de 96 pocillos profundos y las soluciones proteicas se filtraron mediante centrifugación a 1500 g durante 15 minutos en una centrífuga de escritorio. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante la medición de A280 en el filtrado usando un instrumento DropSense (Trinean).

Ejemplo 2: Caracterización de los mAb anti-CD33

45 Los anticuerpos OmniRat identificados mediante inmunización, clonados en la región V y posteriormente expresados y purificados se caracterizaron adicionalmente por su unión a células que expresan CD33 y por su unión a antígenos recombinantes. Se evaluó la unión de los anticuerpos purificados a células HEK293F transfectadas de manera estable que expresaban CD33 de humano o CD33 de cynomolgus (generación descrita anteriormente) junto con el HEK293F original como control negativo. Las células se recolectaron de matraces de cultivo tisular usando un regulador de disociación no enzimática (Thermo Scientific). Los matraces se enjuagaron dos veces con PBS y se añadió regulador de disociación al matraz, y el matraz se incubó durante 10 minutos a 37 °C hasta que las células se volvieron no adherentes. Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se resuspendieron a $1,0 \times 10^6$ células/ml en regulador de tinción (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ). Se sembraron 50.000 células/pocillo de cada tipo celular en 50 µl de regulador de tinción en placas de fondo redondo (Becton Dickinson). Se añadieron 50 µl de mAb de prueba de concentración 2x o control de isotipo a 3 diluciones y cero (120 nM, 12 nM y 1,2 nM y 0 nM), y la solución resultante se incubó 30 minutos a 4 °C. Se añadieron 100 µl de regulador de tinción a todos los pocillos de cada placa, las placas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se retiró el regulador, se añadieron 200 µl de regulador de tinción a todos los pocillos de cada placa, las placas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se retiró el regulador. 50 µl de 2 µg/ml de anticuerpo secundario contra el Fc AF647 humano de cabra (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA) se añadió a todos los pocillos de las placas y las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Se añadieron 100 µl de regulador de tinción a todos los pocillos de las placas, las placas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se retiró el regulador. Se añadieron 200 µl de regulador de operación (el regulador de operación es regulador de tinción, EDTA 1 mM, ácido plurónico al 0,1 %) a todos los pocillos de las placas, las placas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se retiró el regulador. Se añadieron 30 µl de regulador circulante que contenía colorante vivo o muerto Sytox Green (ThermoFisher) a todos los pocillos con células y las placas se leyeron en un citómetro de flujo iQue IntelliCyt. Las células se separaron mediante dispersión frontal frente a dispersión lateral para eliminar los residuos,

después en singletes y después en células vivas que excluyeron la tinción Sytox. La unión del anticuerpo se evaluó mediante la intensidad de fluorescencia media en el canal AF647.

Para comenzar a evaluar las propiedades de unión biofísicas de los mAb purificados, se realizó un cribado de velocidad de disociación. Se probaron 76 mAb anti-CD33 OmniRat para determinar su unión a las proteínas CD33 ECD-HSA (C33W2) y CD33 ECD-HSA de cynomolgus (C33W1) humanas recombinantes (producción de Janssen) y la tasa de disociación se midió mediante la plataforma de matriz SPRI IBIS MX96 (Carterra; Newton, Pensilvania). La IgG Fc antihumana de cabra (Jackson ImmunoResearch, n.º de catálogo 109-005-098) se inmovilizó directamente mediante acoplamiento con aminas a 100 µg/ml en regulador de acetato, pH 4,5, usando un chip sensor CMD50 m (Xantec, lote CMD50 m 0415.a) con un tiempo de asociación de 10 minutos en el instrumento IBIS. Se alcanzó un nivel promedio de inmovilización de GAH-Fc de ~ 9000 Rus. El chip sensor se transfirió a la unidad Microspotter de flujo continuo (CFM) para capturar cada mAb anti-CD33 a 10 µg/ml durante 10 minutos. La unión se midió en IBIS Sprl mediante una cinética de ciclo único sin regeneración. Cada serie de concentraciones de antígeno (3 µM en series de dilución triple) se inyectó secuencialmente desde concentraciones bajas (0,46 nM) a altas (3 µM) para unirse a los mAb capturados con un tiempo de asociación de 5 minutos y un tiempo de disociación de 15 minutos usando PBST (PBS con Tween al 0,005 %) como regulador de ejecución. Los datos de unión sin procesar (formato de archivo .trix) se referenciaron y alinearon con el software SprintX (Wasatch, Ver 1.9.3.2) y después se exportaron (formato de archivo.ibm) al software Scrubber (Ver. 2.0) para análisis cinéticos de unión 1:1 (Wasatch, versión 2.0.0.33) para extraer los resultados K_{off} .

La tabla 4 siguiente resume los 32 clones principales evaluados mediante la unión a líneas celulares humanas y que expresan CD33 de cynomolgus, así como al antígeno recombinante (tasa de disociación de al menos $>10e-3$ para uno de los antígenos). De estas 32, todas menos 4 mostraron una unión apreciable a células expresantes de humano o cynomolgus. Los 32 se llevaron a cabo para su posterior caracterización mediante agrupamiento de epítopos y análisis cinético completo.

Tabla 4. Análisis de la unión celular y la velocidad de disociación de los anticuerpos anti-CD33 derivados de OMNIrat

Prot. AA ID	%Mon	60nM CD33	6nM CD33	0.6nM CD33	0nM CD33	kD
C33B48	91,96	400995,84	428948,75	391157,69	91,12	5.47E-05
C33B73	100,00	201493,02	33443,28	4034,64	93,98	9.12E-05
C33B125	98,48	258779,13	79728,78	9203,75	78,26	1.54E-04
C33B55	96,39	188278,42	59155,10	7625,56	105,39	2.15E-04
C33B96	98,75	476040,28	475653,41	187925,80	55,23	2.28E-04
C33B124	100,00	798,33	126,37	90,26	172,03	2.38E-04
C33B72	96,94	328194,72	105474,59	12506,85	93,32	2.84E-04
C33B79	100,00	236644,03	41925,89	4988,81	77,78	3.28E-04
C33B77	92,11	241787,16	88691,05	11484,97	69,46	3.37E-04
C33B82	96,21	188508,56	41264,92	5033,60	73,44	3.41E-04
C33B87	100,00	242185,48	79532,87	12547,05	73,65	3.52E-04
C33B80	98,33	5799,64	409,97	114,93	88,88	3.84E-04
C33B101	96,91	268805,28	204984,16	35513,63	70,07	3.98E-04
C33B83	98,07	92956,55	7856,70	1020,48	87,37	4.61E-04
C33B46	95,81	509865,97	447627,97	418017,22	134,53	4.67E-04
C33B94	98,31	200142,00	93852,22	13274,87	89,59	5.38E-04
C33B88	98,36	393148,13	481100,91	274293,53	94,81	8.25E-04
C33B66	98,71	444680,31	313288,41	56628,04	129,73	8.59E-04
C33B120	97,63	190036,14	60357,11	7054,28	92,94	1.40E-03
C33B64	98,13	200158,36	54138,77	7556,04	114,85	1.71E-03
C33B52	96,76	196557,09	46286,13	6751,01	82,46	3.13E-03
C33B56	95,59	143,73	79,73	111,95	138,04	4.02E-03
C33B75	98,68	163795,25	29603,57	4517,81	95,94	4.16E-03

ES 2 998 890 T3

	Prot. AA ID	%Mon	60nM CD33	6nM CD33	0.6nM CD33	0nM CD33	kD
5	C33B107	96,90	375388,25	339798,53	161369,64	86,54	4.44E-03
	C33B63	98,79	247758,77	62221,71	9671,48	86,34	4.57E-03
	C33B95	97,77	154556,58	44354,07	6402,00	87,38	5.99E-03
	C33B61	98,87	198777,34	38699,10	5308,45	79,84	6.71E-03
10	C33B89	100,00	315,38	119,12	65,61	70,94	8.11E-03
	C33B122	98,49	259183,69	84281,03	14291,17	65,01	8.74E-03
	C33B62	99,05	157786,36	37359,44	6092,03	75,00	1.00E-02
15	C33B123	95,08	224078,95	88155,99	8864,39	71,05	1.03E-02
	C33B54	100,00	147753,30	27461,06	3766,69	61,26	2.48E-02

	Prot. AA ID	60 nM CD33 de cynomolgus	6 nM CD33 de cynomolgus	0,6 nM CD33 de cynomolgus	0 nM CD33 de cynomolgus	Kd de unión a cynomolgus CD33
20	C33B48	56491,32	47326,85	43351,12	94,01	1.20E-04
	C33B73	14799,14	6987,92	795,57	72,51	4.08E-04
	C33B125	15603,45	11526,47	3458,27	70,22	3.51E-04
25	C33B55	16020,78	9994,42	2433,94	69,38	1.16E-04
	C33B96	37273,19	20087,29	11574,59	86,31	8.19E-04
	C33B124	593,00	132,19	77,26	98,41	4.77E-04
30	C33B72	19422,07	13975,14	3894,84	90,81	7.63E-04
	C33B79	15538,97	6427,73	1082,85	63,59	6.82E-03
	C33B77	17516,20	11665,49	3601,76	85,23	4.18E-04
35	C33B82	14269,38	6622,07	1540,09	84,24	6.70E-04
	C33B87	19597,18	12652,44	3266,36	103,07	2.28E-04
	C33B80	4612,58	248,60	108,93	82,38	2.66E-04
40	C33B101	48016,75	46115,96	17989,37	79,69	1.06E-04
	C33B83	5304,40	687,44	159,37	87,35	2.17E-03
	C33B46	49840,14	49816,36	49729,78	92,05	1.48E-04
45	C33B94	16126,84	10782,54	3183,70	87,82	5.37E-04
	C33B88	50388,18	43928,95	43940,23	90,13	3.89E-04
	C33B66	48905,04	49076,39	42160,22	77,96	9.33E-05
50	C33B120	13211,32	7865,37	2726,18	75,77	8.54E-04
	C33B64	21109,59	9685,04	3102,56	99,82	1.21E-03
	C33B52	12582,90	8444,39	2063,44	75,24	1.20E-03
	C33B56	104,27	85,94	78,56	83,31	8.46E-04
55	C33B75	12194,41	5577,80	1709,40	124,32	1.20E-03
	C33B107	50325,07	47810,05	36786,69	55,11	1.35E-04
	C33B63	18322,71	11642,38	2879,89	87,94	9.47E-04
60	C33B95	14774,34	9594,12	1637,99	80,81	6.98E-03
	C33B61	13552,71	8211,09	1595,90	106,84	1.83E-03
	C33B89	47301,14	34193,78	23334,20	112,80	4.65E-05
65	C33B122	19740,29	13907,32	5838,25	82,53	1.45E-03

Prot. AA ID	60 nM CD33 de cynomolgus	6 nM CD33 de cynomolgus	0,6 nM CD33 de cynomolgus	0 nM CD33 de cynomolgus	Kd de unión a cynomolgus CD33
C33B62	12737,71	5620,17	1922,97	934,44	1.32E-03
C33B123	10665,93	10404,03	3232,18	61,08	2.74E-03
C33B54	50466,68	43011,75	38091,89	28785,80	1.35E-04

A continuación, el panel de mAb se caracterizó adicionalmente para un análisis de afinidad completo, así como para la unión de epítomos. La unión de los mAb anti-CD33 a CD33 ECD-HSA humano recombinante (C33W2) y a CD33 ECD-HSA de cynomolgus (C33W1) se midió mediante ProteOn SPR (Bio-Rad). La IgG Fc antihumana de cabra (Jackson ImmunoResearch, n.º de catálogo 109-005-098) se inmovilizó directamente mediante acoplamiento de aminas a 30 µg/ml en regulador de acetato, pH 5,0 en los 6 canales de ligando en orientación vertical en un chip sensor GLC (Bio-Rad, número de catálogo 176-5011) con un caudal de 30 µl/min en PBS que contenía un 0,005 % de Tween-20. Las densidades de inmovilización promediaron aproximadamente 5000 unidades de respuesta (RU) con una variación menor que 5 % entre los diferentes canales. Se capturaron diferentes mAb en la superficie antiFc IgG humana a 0,25 o 0,5 µg/ml (160 ~ 300 RU) en orientación vertical del ligando, con el 6.º canal del ligando como control de la superficie del ligando. Las proteínas CD33-HSA humanas y de cynomolgus con una concentración de 0,3 µM en series de dilución de 3 veces de 5 concentraciones entraron como analito para unirse a los mAb capturados en la orientación horizontal. También se inyectó una muestra de regulador en el 6.º canal para controlar la disociación del mAb capturado y la estabilidad basal. La fase de disociación de todas las concentraciones de CD33-HSA de humano y de cynomolgus se monitorizó a un caudal de 100 p/min durante 15 minutos para determinar la unión al C33B782, 60 minutos para la unión al C33B912 (idéntico al C33B904 con hlgG4), seguida de la regeneración mediante un pulso de 18 segundos de ácido fosfórico al 0,85 % para eliminar el antígeno y el mAb unido. Los datos de licitación sin procesar se procesaron mediante doble referencia después de restar los datos de respuesta de: 1) el punto intermedio para corregir las interacciones no específicas entre la Ag y la superficie vacía del chip; 2) el canal amortiguador para corregir la desviación de la línea de base debida a la disociación de la superficie del mAb capturado a lo largo del tiempo. Los datos procesados a todas las concentraciones de antígeno para cada mAb se ajustaron globalmente a un modelo de unión de Langmuir simple 1:1 para extraer estimaciones de las constantes cinéticas (K_{on} , K_{off}) y de afinidad (KD).

Para determinar si todos los mAb se unen a 1 epítipo distinto o si había una amplia cobertura de epítomos, se realizó un experimento de agrupamiento de epítomos. La agrupación de epítomos competitiva de los mAb CD33 se realizó en un instrumento IBIS SPRI (Carterra) usando un chip de prisma sensor CMD-200M. Cada anticuerpo anti-CD33 se inmovilizó directamente mediante acoplamiento de amina en el chip a 10 µg/ml en regulador de acetato (pH 4,5) usando un Microspotter de flujo continuo (CFM) independiente. Después, el chip sensor impreso se transfirió al instrumento IBIS para los análisis de agrupamiento usando un formato de agrupamiento clásico o "sándwich". La unión se realizó mediante inyección secuencial de CD33 ECD-HSA humano (C33W2) a 50 nM, seguida de una única inyección de mAb anti-CD33 como analito competidor en solución a 133 nM para unirse a los mAb anti-CD33 inmovilizados con regeneración de la superficie después de cada ciclo de inyección secuencial de antígeno y anticuerpo.

Para monitorizar la actividad de los mAb inmovilizados antes y después de la regeneración, se realizó una inyección de regulador sin ningún mAb competidor al principio y al final del experimento para medir la actividad de unión al antígeno solo. La respuesta de la unión del mAb que compete con respecto a la unión del regulador (solo el antígeno) es una indicación de si el anticuerpo en solución bloquea o intercala la unión del antígeno a los mAb inmovilizados. Los datos de agrupamiento sin procesar (formato de archivo.trix) se referenciaron y pusieron a cero con el software SprinTX (Wasatch, Ver 1.9.3.2) y, a continuación, se exportaron (formato de archivo.ibm) al software de agrupamiento HitTools.exe (Wasatch, versión 2.0.0.33) para su análisis. Los datos se seleccionaron eliminando los anticuerpos con respuestas antigénicas inferiores a 20 RU y los anticuerpos que no se autobloqueaban. Las respuestas de los mAb competidoras se normalizaron en relación con la respuesta de unión al antígeno solo. Los anticuerpos con respuestas normalizadas < 0,25 se denominaron bloqueadores, y aquellos con respuestas normalizadas ≥ 0,25 se denominaron no bloqueadores/intercaladores. Se predijeron diferentes contenedores usando un corte a una altura de 2,5 en la gráfica de dendrogramas combinados.

La siguiente tabla resume el análisis cinético completo y la agrupación de epítomos de 32 mAb seleccionados. Hay un total de 8 mAb anti-CD33 que tienen afinidad subnanomolar tanto por CD33 de humano como por CD33 de cynomolgus y estos mAb corresponden a 3 grupos de epítomos distintos, mientras que el panel más grande tiene un rango de afinidades y 7 grupos de epítomos distintos.

Tabla 5. Análisis cinético completo y agrupamiento de epítomos de mAb derivados de OMNIRat

CD33 ECD-HSA de humano					
Prot. AA ID	ID de región V	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Contenedor de epítomos
C33B48	C33F53	1.62E+06	1.82E-05	1.12E-11	1

ES 2 998 890 T3

CD33 ECD-HSA de humano						
Prot. AA ID	ID de región V	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Contenedor de epítopos	
5	C33B46	C33F51	1.45E+06	1.99E-03	1.38E-09	1
	C33B66	C33F71	3.85E+04	2.03E-03	5.29E-08	1
	C33B107	C33F112	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	1
10	C33B88	C33F93	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	1
	C33B96	C33F101	2.26E+05	4.36E-04	1.92E-09	3
	C33B101	C33F106	1.62E+05	1.08E-03	6.64E-09	3
15	C33B73	C33F78	5.59E+05	5.59E-05	1.00E-10	4
	C33B125	C33F130	9.92E+05	1.34E-04	1.40E-10	4
	C33B55	C33F60	9.85E+05	2.53E-04	2.60E-10	4
20	C33B82	C33F87	4.45E+05	2.70E-04	6.10E-10	4
	C33B83	C33F88	2.70E+05	5.21E-04	1.93E-09	4
	C33B75	C33F80	3.85E+05	4.41E-03	1.14E-08	4
25	C33B123	C33F128	1.02E+06	1.52E-02	1.48E-08	4
	C33B52	C33F57	2.06E+05	3.96E-03	1.92E-08	4
	C33B61	C33F66	4.89E+05	1.05E-02	2.14E-08	4
30	C33B62	C33F67	5.07E+05	1.26E-02	2.49E-08	4
	C33B64	C33F69	4.33E+05	2.21E-03	5.10E-09	4
	C33B63	C33F68	5.33E+05	3.74E-03	7.01E-09	4
35	C33B122	C33F127	7.47E+05	7.12E-03	9.53E-09	4
	C33B72	C33F77	8.71E+05	2.00E-04	2.30E-10	5
	C33B79	C33F84	5.15E+05	3.90E-04	7.60E-10	5
40	C33B77	C33F82	8.28E+05	2.62E-04	3.20E-10	6
	C33B87	C33F92	7.20E+05	4.32E-04	6.00E-10	6
	C33B94	C33F99	9.22E+05	5.85E-04	6.30E-10	6
45	C33B95	C33F100	4.82E+05	7.40E-03	1.54E-08	6
	C33B120	C33F125	5.75E+05	1.68E-03	2.93E-09	6
	C33B89	C33F94	unión baja	unión baja	unión baja	8
50	C33B54	C33F59	unión baja	unión baja	unión baja	9
	C33B124	C33F129	3.57E+05	1.24E-04	3.50E-10	NB
	C33B80	C33F85	3.23E+05	4.25E-04	1.32E-09	NB
	C33B56	C33F61	unión baja	unión baja	unión baja	NB

CD33 ECD-HSA de cynomolgus						
Prot. AA ID	ID de región V	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Contenedor de epítopos	
55	C33B48	C33F53	4.31E+06	1.58E-04	3.66E-11	1
	C33B46	C33F51	2.97E+06	3.75E-04	1.26E-10	1
	C33B66	C33F71	1.22E+06	2.66E-04	2.17E-10	1
60	C33B107	C33F112	3.31E+05	7.01E-05	2.12E-10	1
	C33B88	C33F93	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	1
	65	C33B96	C33F101	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta

CD33 ECD-HSA de cynomolgus					
Prot. AA ID	ID de región V	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Contenedor de epítomos
C33B101	C33F106	2.25E+05	2.69E-04	1.20E-09	3
C33B73	C33F78	6.00E+05	5.08E-04	8.46E-10	4
C33B125	C33F130	1.12E+06	3.39E-04	3.04E-10	4
C33B55	C33F60	1.16E+06	8.37E-05	7.23E-11	4
C33B82	C33F87	5.45E+05	7.51E-04	1.38E-09	4
C33B83	C33F88	2.47E+05	2.88E-03	1.17E-08	4
C33B75	C33F80	6.16E+05	1.32E-03	2.15E-09	4
C33B123	C33F128	1.26E+06	3.39E-03	2.69E-09	4
C33B52	C33F57	3.13E+05	1.48E-03	4.74E-09	4
C33B61	C33F66	7.34E+05	1.62E-03	2.21E-09	4
C33B62	C33F67	8.05E+05	1.49E-03	1.85E-09	4
C33B64	C33F69	5.90E+05	1.01E-03	1.71E-09	4
C33B63	C33F68	7.23E+05	8.80E-04	1.22E-09	4
C33B122	C33F127	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	unión/no se ajusta	4
C33B72	C33F77	9.19E+05	5.40E-04	5.87E-10	5
C33B79	C33F84	5.48E+05	2.20E-03	4.01E-09	5
C33B77	C33F82	1.08E+06	2.66E-04	2.47E-10	6
C33B87	C33F92	1.12E+06	2.64E-04	2.36E-10	6
C33B94	C33F99	1.10E+06	5.20E-04	4.73E-10	6
C33B95	C33F100	8.44E+05	8.06E-03	9.56E-09	6
C33B120	C33F125	8.76E+05	9.02E-04	1.03E-09	6
C33B89	C33F94	2.65E+05	2.01E-04	7.60E-10	8
C33B54	C33F59	1.32E+06	6.37E-04	4.84E-10	9
C33B124	C33F129	4.67E+05	4.72E-04	1.01E-09	NB
C33B80	C33F85	4.92E+05	2.59E-04	5.27E-10	NB
C33B56	C33F61	unión baja	unión baja	unión baja	NB

El panel OmniMouse (8 mAb en total) se generó por separado y se caracterizó adicionalmente para determinar su unión a las células. La unión celular se realizó como se describió anteriormente y se resume en la tabla siguiente. De los 8 mAb ensayados, 6 se unieron directamente a las células que expresan CD33, mientras que 2 no lo hicieron.

Tabla 6. Unión celular de mAb derivados de OMNIMouse a líneas celulares expresante humanas y de cynomolgus

mAb	Parental				CD33 de humano			
	60 nM	6 nM	0,6 nM	0 nM	60 nM	6 nM	0,6 nM	0 nM
C33B909	253,50	206,04	169,77	119,51	176,49	170,25	154,00	191,28
C33B910	193,52	176,14	108,46	190,17	213,55	183,33	151,25	155,29
C33B911	1466,02	389,41	186,22	113,30	237954,27	100333,48	13501,02	114,07
C33B912	977,91	273,07	140,62	124,53	237140,86	101295,70	15726,96	149,54
C33B913	174,49	118,08	123,26	129,07	518952,00	409071,06	204694,14	127,82
C33B914	181,37	142,74	139,10	113,48	304350,88	315129,56	153252,58	185,45
C33B915	101,28	147,65	143,51	100,00	390477,25	362902,66	138398,56	112,22

	Parental				CD33 de humano			
mAb	60 nM	6nM	0,6 nM	0 nm	60 nM	6 nM	0,6 nM	0 nM
C33B916	416,08	145,16	115,70	91,75	447815,47	404033,19	192941,55	167,07

CD33 de cynomolgus				
mAb	60 nM	6nM	0,6 nM	0 nm
C33B909	180,33	135,33	115,73	124,03
C33B910	202,42	135,18	116,71	175,97
C33B911	17036,56	7729,14	1935,16	97,94
C33B912	15070,88	7271,38	1726,03	124,69
C33B913	40661,90	36920,95	35224,10	106,19
C33B914	44964,85	33368,26	22086,01	86,76
C33B915	37495,34	35692,21	36165,59	113,92
C33B916	41004,43	33294,78	22790,61	104,43

Los 6 mAb que se unieron al CD33 en las células se caracterizaron adicionalmente biofísicamente mediante un análisis cinético completo del antígeno recombinante usando los métodos descritos anteriormente y resumidos en la tabla siguiente. De los 6 mAb ensayados, 1 se unió a CD33 de humano con una afinidad picomolar (C33B912) y subnanomolar por CD33 de cynomolgus, mientras que 1 tenía una afinidad muy fuerte por CD33 de humano, pero solo una afinidad nanomolar por CD33 de cynomolgus (C33B911). Dos clones más eran subnanomolares tanto para CD33 de humano como para CD33 de cynomolgus (C33B913 y C33B916), pero ninguna de las afinidades estaba en el rango de C33B912.

Tabla 7. Análisis cinético completo de los mAb derivados de OmniMouse

	CD33 ECD-HSA de humano			CD33 ECD-HSA de cynomolgus		
mAb	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
C33B911	1.10E+06	4.14E-05	3.78E-11	1.15E+06	1.15E-03	1.00E-09
C33B912	1.42E+06	4.29E-05	3.02E-11	1.50E+06	6.50E-04	4.33E-10
C33B913	6.60E+05	6.40E-04	9.69E-10	2.56E+06	3.08E-04	1.20E-10
C33B914	4.44E+05	9.80E-03	2.21E-08	5.29E+05	2.33E-04	4.40E-10
C33B915	2.18E+05	9.89E-04	4.53E-09	3.81E+06	8.93E-05	2.34E-11
C33B916	6.27E+05	4.11E-04	6.55E-10	4.73E+05	4.03E-04	8.52E-10

Se realizó un experimento de agrupamiento de epítomos en los 6 mAb de unión a células derivados de OmniMouse junto con varios mAb de control identificados previamente en la campaña anterior de OmniRat. Los mAb de control se eligieron en función de su afinidad subnanomolar hacia CD33 de humano y del número de grupos de epítomos distintos. El software de agrupamiento HTTools asigna los números de agrupamiento de epítomos por experimento y, por lo tanto, tener varios controles para los grupos de epítomos ya definidos era fundamental para la comparación cruzada. Los dos clones de alta afinidad de CD33 de humano derivados de OmniMouse (C33B911 y C33B912) se agruparon ambos con los clones del contenedor 4 anterior (contenedor 4 en este experimento), mientras que el clon subnanomolar (C33B916) se agrupó en 2 aquí junto con C33B836 (contenedor 1 en el experimento anterior).

Tabla 8: Contenedores de epítomos de mAb anti-CD33 de OMNIMOUSE

mAb	ID de región V	Contenedor de epítomos
C33B915	C33F553	1
C33B916	C33F554	2
C33B836	C33F53	2
C33B914	C33F552	2
C33B913	C33F551	3

mAb	ID de región V	Contenedor de epítomos
C33B806	C33F106	3
C33B911	C33F549	4
C33B912	C33F550	4
C33B778	C33F78	4
C33B830	C33F130	4
C33B782	C33F82	5
C33B792	C33F92	5
C33B799	C33F99	5
C33B760	C33F60	6
C33B777	C33F77	7

CD33 está compuesto por 2 dominios de IgG, el dominio V distal de la membrana y el dominio C2 proximal de la membrana. El SNP rs12459419 puede provocar que el empalme alternativo selectivo del transcrito del preARNm de CD33 produzca una forma que solo se expresa en C2 en las células y, por lo tanto, dirigirse a este dominio puede proporcionar un beneficio clínico. Para determinar a cuál de los dos dominios podían unirse los mAb, se realizó un cribado de disociación siguiendo el protocolo anterior en 6 mAb con la capacidad de unión más alta que cubría 4 grupos de epítomos distintos usando la CD33 ECD-HSA de humano, CD33 V-HSA de humano y CD33 C2-HSA de humano como antígenos de unión. Como se muestra en la tabla siguiente, los dos clones previamente agrupados en el contenedor 4 se unieron al dominio C2 del huCD33 pero no al dominio V del huCD33, mientras que los clones en los contenedores 2 y 3 se unieron al dominio V pero no al dominio C2. Dos clones agrupados en el grupo 5 no se unieron a ninguno de los dominios y, por lo tanto, su ubicación de unión exacta podría abarcar los dos dominios. En este experimento se incluyeron tres (3) mAb disponibles comercialmente (WM53 (EMD Millipore; Darmstadt, Alemania), P67.7 (Biolegend, San Diego, CA) y el clon 906 de LSBio (LifeSpan Biosciences, Seattle, WA)) y todos mostraron unión al dominio V, pero no al dominio C2. Si observamos las agrupaciones de epítomos de las Tablas 5 y 8 en relación con los datos de unión al dominio C2 de la Tabla 9, hay un total de 15 mAb que podrían unirse potencialmente al dominio C2 con afinidades de ~25 nM a ~30 pM en la proteína humana de longitud completa.

Tabla 9. Unión de dominio desfasado

	huCD33 ECD-HSA	huCD33-V-HSA	huCD33-C2-HSA	Contenedor de epítomos
ID de proteína	kd (1/s)	kd (1/s)	kd (1/s)	
C33B912	1.29E-05	Respuesta de unión nula/baja	6.68E-05	4
C33B778	4.72E-05	Respuesta de unión nula/baja	2.57E-03	4
C33B782	2.58E-04	Respuesta de unión nula/baja	Respuesta de unión nula/baja	5
C33B792	4.27E-04	Respuesta de unión nula/baja	Respuesta de unión nula/baja	5
C33B836	5.52E-05	3.71E-05	Respuesta de unión nula/baja	2
C33B806	1.36E-03	3.18E-03	Respuesta de unión nula/baja	3
WM53	2.37E-03	3.78E-02	Respuesta de unión nula/baja	
P67.7	1.05E-03	2.43E-03	Respuesta de unión nula/baja	
Clon 906 de LSBio	2.45E-03	4.34E-02	Respuesta de unión nula/baja	

Para respaldar otros estudios *in vivo* e *in vitro*, se eligieron clones seleccionados (C33B836, C33B782, C33B778, C33B904, C33B806, C33B830, C33B937, C33B792, C33B760 y C33B777) para el intercambio de brazos de fab y a gran escala para producir moléculas DuoBody bispecíficas con anticuerpos anti-CD3. Las células ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific) se sembraron a razón de $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$ células viables/ml en el medio de expresión ExpiCHO™ y se cultivaron en matraces de batido Erlenmeyer desechables, estériles, ventilados y sin deflectores en una incubadora con agitador a 37 °C y con un 7 % de CO₂ (INFORS HT Multitron Pro). Para el crecimiento celular rutinario en matraces con agitación de 125 ml a 2 litros, la velocidad de agitación se estableció en 130 rpm para los agitadores con un diámetro de agitación de 19 mm. Las células se subcultivaron cuando la densidad alcanzó la fase logarítmica de crecimiento de 4×10^6 - 6×10^6 células viables/ml con una viabilidad del 98-99 %.

Dos días antes de la transfección, las células ExpiCHO-S™ se sembraron a $1,5 \times 10^6$ células viables/ml para el volumen de cultivo requerido. El día de la transfección, se determinaron la densidad celular viable y el porcentaje de viabilidad. Las células se transfectaron a una densidad de 6×10^6 células viables/ml. Para una transfección óptima, se usó ADN plasmídico de cadena pesada y ligera estéril a una concentración ≥ 1 mg/ml en regulador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

Las células ExpiCHO-S™ se transfectaron siguiendo el protocolo de transfección Max Titer del fabricante (número de publicación de ThermoFisher MAN0014337). Todas las cantidades y volúmenes que se muestran a continuación fueron por ml del volumen de cultivo transfectado final. En resumen, el ADN plasmídico se diluyó con 0,04 ml de medio OptiPRO™ frío (ThermoFisher Scientific) en la siguiente proporción: 0,125 µg de ADN de cadena pesada: 0,375 µg de ADN de cadena ligera: 0,5 µg de pAdvantage. Se diluyeron 6,4 ml de reactivo de transfección de CHO ExpiFectamine™ y se mezclaron suavemente con 0,04 ml de medio OptiPRO™ frío y se incubaron durante 1 min. El reactivo de CHO ExpiFectamine™ diluido se añadió al ADN diluido, se mezcló suavemente y los complejos de CHO/ADN plasmídico de ExpiFectamine™ se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras la incubación, los complejos se añadieron a las células ExpiCHO-S™ en un matraz agitador y se incubaron durante la noche en una incubadora agitadora a 37 °C y con un 7 % de CO₂.

Para el protocolo Max Titer, el día 1 después de la transfección, se añadieron 6 µl de potenciador de CHO ExpiFectamine™ y 160 µl de pienso ExpiCHO™ y el matraz se transfirió a una incubadora agitadora a 32 °C con un 7 % de CO₂. El día 5 después de la transfección, se añadieron 160 µl de pienso ExpiCHO™ por segunda vez al matraz y se devolvieron a la incubadora a 32 °C con agitación. El cultivo se recolectó el día 12 después de la transfección, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos y se aclaró a través de una cápsula de filtro Acropak 1500 de 0,2 µm (Pall).

Los anticuerpos expresados se purificaron a partir de los sobrenadantes clarificados usando MabSelect Sure Resin (GE Healthcare). Las columnas SuRe Protein A de MabSelect se equilibraron con 1x D-PBS, pH 7,2, antes de cargar los sobrenadantes de los cultivos individuales. Las proteínas no unidas se eliminaron lavándolas extensamente con 1x D-PBS, pH 7,2. Las proteínas unidas se eluyeron con acetato de Na 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones de los picos se neutralizaron con Tris 2,5 M, pH 7,2, y se combinaron. Los grupos de fracciones neutralizadas se dializaron en 1 x dPBS para los ensayos y la caracterización biofísica o se utilizaron para el ensamblaje biespecífico de DuoBody.

La concentración de proteína para cada grupo de elución se determinó midiendo la absorbancia a OD280 nm y se calculó usando el coeficiente de extinción de la absorbancia basado en la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 3: Intercambio de brazos Fab usando mAb parentales purificados

La formación de los anticuerpos biespecíficos CD33 × CD3 requiere dos mAb parentales, uno específico para el grupo diana (p. ej., CD33) y otro específico para el grupo efector (p. ej., CD3). Los mAb CD33 se recombinaron con brazos de un brazo de CD3 de alta afinidad (CD3B219) o de baja afinidad (CD3B376). Estos mAb parentales están en el formato IgG4 PAA (Labrijn y col., 2013), donde el progenitor diana (CD33) contiene la mutación K409R (aminoácido nativo de la IgG4), mientras que el progenitor destructor (CD3) contiene la mutación F405L y R409K. El anticuerpo monoespecífico anti-CD3 se expresó como IgG4, con las sustituciones Fc S228P, F234A, L235A, F405L y R409K (brazo CD3) (numeración según el índice de la UE) en sus regiones Fc. Los anticuerpos monoespecíficos se expresaron y purificaron como se describió anteriormente. Tras la purificación, los anticuerpos CD33 parentales se mezclaron con el anticuerpo CD3 parental deseado en condiciones reductoras en 75 mM de cisteamina-HCl y se incubaron a 31 °C durante 5 horas. Las reacciones de recombinación se basaron en proporciones molares, en las que se combinó una cantidad determinada de anticuerpo CD33 (p. ej., 10 mg o ~74,6 nanomoles) con el anticuerpo CD3 (p. ej., ~67,8 nanomoles), en las que el anticuerpo CD33 se añadió en un exceso del 6 % del anticuerpo CD3. Las concentraciones de las reservas de anticuerpos CD33 variaron de 0,8 a 6 mg/ml, y los volúmenes de las reacciones de recombinación variaron para cada apareamiento. Las reacciones de recombinación se dializaron posteriormente durante una noche contra PBS para eliminar el reductor. Las reacciones de los anticuerpos biespecíficos contra CD33×CD3 se realizaron con un exceso del anticuerpo contra CD33 (proporción) para minimizar la cantidad de anticuerpo parental contra CD3 que no había reaccionado que quedaba después de la recombinación.

Los anticuerpos biespecíficos CD33 × CD3 finales producidos, junto con los mAb parentales (es decir, CD33, CD3 o Nulo) utilizados en las reacciones de recombinación se enumeran en la Tabla 10.

Los impactos seleccionados de CD33 también se combinaron con un brazo no destructor (nulo) para crear controles negativos con fines de prueba. Para los anticuerpos biespecíficos de control, B2M1, se generó un anticuerpo contra el RSV en formato IgG4 PAA, se purificó y se combinó con los brazos CD3 CD3B219 y CD3B376 -F405L, R409K para generar brazos CD3B288 (CD3xNull) y CD3B510 (CD3B376xNull) o CD33, C33B836, C33B806, C33B782, C33B792, C33B760, C33B830, C33B799, C33B778, C33B777 para generar C33B941, C33B943, C33B946, C33B945, C33B949, C33B942, C33B944, C33B947, C33B948, respectivamente (CD33xNull).

Tabla 10: Anticuerpos biespecíficos CD33 × CD3

ES 2 998 890 T3

	Ab biespec.	Parental	ID de HTC Pep	Id. de sec. de HC Pep	Id. de sec. de HC Nuc	ID LC Pep	Id. de sec. de LC Pep	Id. de sec. de LC Nuc
5	C3CB7	C33B836	C33H80	52	94	C33L73	136	178
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
10	C3CB5	C33B830	C33H84	51	93	C33L66	135	177
		CD3B219	CD3H141	244	147	CD3L66	250	253
15	C3CB4	C33B806	C33H69	50	92	C4LL152	134	176
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
20	C3CB16	C33B799	C33H98	49	91	C33L69	133	175
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
25	C3CB14	C33B792	C33H87	48	90	C33L35	132	174
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
30	C3CB12	C33B782	C33H72	47	89	C33L40	131	173
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
35	C3CB11	C33B778	C33H66	46	88	C33L60	130	172
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
40	C3CB10	C33B777	C33H65	45	86	C33L47	129	171
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
45	C3CB8	C33B760	C33H45	44	85	C33L11	128	170
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
50	C3CB97	C33B836	C33H80	52	94	C33L73	136	178
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
55	C3CB98	C33B830	C33H84	51	93	C33L66	135	177
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
60	C3CB99	C33B806	C33H69	50	92	C4LL152	134	176
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
65	C3CB100	C33B799	C33H98	49	91	C33L69	133	175
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
70	C3CB101	C33B792	C33H87	48	90	C33L35	132	174
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
75	C3CB102	C33B782	C33H72	47	89	C33L40	131	173
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
80	C3CB103	C33B778	C33H66	46	88	C33L60	130	172
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
85	C3CB104	C33B777	C33H65	45	86	C33L47	129	171
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
90	C3CB105	C33B760	C33H45	44	85	C33L11	128	170
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
95	C33B941	C33B836	C33H80	52	94	C33L73	136	178
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
100	C33B942	C33B830	C33H84	51	93	C33L66	135	177
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255

	Ab biespec.	Parental	ID de HTC Pep	Id. de sec. de HC Pep	Id. de sec. de HC Nuc	ID LC Pep	Id. de sec. de LC Pep	Id. de sec. de LC Nuc
5	C33B943	C33B806	C33H69	50	92	C4LL152	134	176
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
	C33B944	C33B799	C33H98	49	91	C33L69	133	175
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
10	C33B945	C33B792	C33H87	48	90	C33L35	132	174
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
	C33B946	C33B782	C33H72	47	89	C33L40	131	173
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
15	C33B947	C33B778	C33H66	46	88	C33L60	130	172
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
	C33B948	C33B777	C33H65	45	86	C33L47	129	171
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
20	C33B949	C33B760	C33H45	44	85	C33L11	128	170
		B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
25	CD3B288	B23B39	B23H1	246	249	B23L3	252	255
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
	CD3B510	B23B39	B23H1	246	249	B23L3	252	255
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
30	C3CB87	C33B903	C33H251	182	198	C33L117	214	230
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
	C3CB88	C33B904	C33H252	183	199	C33L118	215	231
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
35	C3CB89	C33B905	C33H253	184	200	C33L119	216	232
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
	C3CB90	C33B907	C33H255	186	202	C33L121	218	234
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
40	C3CB91	C33B908	C33H256	187	203	C33L122	219	235
		CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
	C3CB189	C33B904	C33H252	183	199	C33L118	215	231
		CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
50								
Pep: Péptido; Nuc: Nucleótido; Id. de sec.: Id. de sec. n.º								

Ejemplo 4: Ensayos de citotoxicidad mediada por células T *in vitro* con anticuerpos biespecíficos CD33xCD3

Se realizaron ensayos de citotoxicidad mediada por células T *in vitro* para evaluar si los aciertos de CD33 combinados con el grupo de CD3 (CD3B219) median la destrucción de la línea celular OCI-AML5 que expresa CD33 de AML. En resumen, las células efectoras (células T de pan adquiridas en Biological Speciality) se recolectaron, se contaron, se lavaron y se resuspendieron a 1×10^6 células/ml en RPMI (Invitrogen) con un 10 % de medio celular FBS (Invitrogen). Las células diana (MOLM13) se marcaron con CFSE (Invitrogen) y se resuspendieron a 2×10^5 células/ml en RPMI con FBS al 10 %. Los efectores y las células diana marcadas con CFSE se mezclaron a E:T = 5:1 en placas estériles de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron 10 µl de bloque Fc (fragmento ReoPro Fc) junto con una alícuota de 5 µl de anticuerpo biespecífico a cada pocillo que contenía diversas concentraciones. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 horas bajo 5 % de CO₂. Después de 48 horas, se añadió el regulador de tinción de células muertas en el infrarrojo cercano LIVE/DEAD® fijable (Life Technologies) a las muestras y los cultivos se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, se lavaron y se resuspendieron en 100-200 ml de regulador FAC. La

citotoxicidad inducida por el fármaco se determinó usando el citómetro de flujo CANTO II (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) y se analizó con el software FlowJo o el software Dive (BD Biosciences). La población de interés son las células CFSE+/vivas/muertas+ doblemente positivas. Como se muestra en la figura 1, todos los anticuerpos multiespecíficos CD33xCD3 inducidos por las células T redirigieron la citotoxicidad celular de las células MOLM-13 CD33⁺ a las 48 h. La tabla 11 resume los valores de la EC₅₀ generados con los anticuerpos multiespecíficos CD33xCD3. Los 4 anticuerpos principales, C3CB10, C3CB12, C3CB7 y C3CB88, se llevaron a cabo para su posterior caracterización.

Tabla 11: Ensayos de citotoxicidad mediados por células T CD33xCD3. Resumen de los valores de EC₅₀ para 13 anticuerpos biespecíficos CD33xCD3

Guías	C3CB8	C3CB10	C3CB28	C3CB12	C3CB14	C3CB16	C3CB5	C3CB7
EC ₅₀ de citotoxicidad (nM)	0,513	0,4728	0,6041	0,2677	0,538	0,6669	1,262	0,02129
Guías	C3CB87	C3CB88	C3CB89	C3CB90	C3CB91			
EC ₅₀ de citotoxicidad (nM)	0,067	0,11	0,41	10,56	0,35			

Ejemplo 5: Reducción *ex vivo* mediada por CD33xCD3 de la activación de los blastos de AML y de las células T en una muestra primaria de AML

Para evaluar más a fondo el potencial de citotoxicidad de los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3, se realizó un ensayo de citotoxicidad *ex vivo* usando sangre entera de pacientes con AML usando los cuatro anticuerpos principales (Figura 2). En este ensayo, se añadieron varios anticuerpos biespecíficos (anticuerpos CD33 emparejados con CD3B219 y CD3B376, brazos CD3) a sangre entera diluida de pacientes con AML durante un período de 48 horas sin proporcionar células T adicionales, ya que este ensayo se basa en la presencia de células T autólogas en la sangre del paciente. A las 48 horas, las muestras se tiñeron con CD3 PerCPCy5.5, CD25 PE, CD33 FITC y CD38 APC (todos los anticuerpos se adquirieron de Biolegend; San Diego, California). A continuación, las muestras se lavaron al menos 3 veces en 1 regulador de lisis Lyse RBC (eBioscience). A continuación, las muestras se tiñeron con el regulador de tinción de células muertas en infrarrojo cercano LIVE/DEAD® Fixable (Life Technologies). El grado de citotoxicidad tumoral se determinó cuantificando primero las células CD33⁺ vivas en la fracción de células cancerosas de pacientes con AML (definidas como células CD3-CD38⁺) en presencia de los anticuerpos biespecíficos. La citotoxicidad se calculó como un porcentaje en relación con el PBS/control no tratado usando la siguiente ecuación: (% CD33⁺ en PBS/control no tratado, % CD33⁺ en muestra tratada)/(% CD33⁺ en PBS/control no tratado). La activación de las células T se calculó como un porcentaje de los eventos de CD25⁺ en la fracción de CD3⁺.

Como se muestra en la figura 2, todos los anticuerpos principales contra CD33 emparejados con cualquiera de los grupos de CD3 (CD3B376 y CD3B219) promovieron una reducción dependiente de la dosis de la citotoxicidad total que se correlacionó con la activación de las células T después de 48 horas. Los anticuerpos de control del grupo nulo (NullxCD3B219 y nullxCD3B376) no mostraron citotoxicidad de las células tumorales ni activación de las células T. Este resultado también demostró que los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 funcionan en un entorno autólogo. Estos resultados son representativos de otras 4 muestras de donantes de AML (datos no mostrados). La Tabla 12 resume los valores de EC₅₀ generados con los anticuerpos multiespecíficos CD33xCD3. Como se desprende de los valores de la EC₅₀, el C33B904 emparejado con cualquiera de los grupos de CD3 (C3CB88, C3CB189) y el C33B836 emparejado con cualquier grupo de CD3 (C3CB7, C3CB97) fueron los anticuerpos más potentes y eficaces. Estos 4 anticuerpos fueron, por lo tanto, el foco de una caracterización adicional.

Tabla 12: Ensayos de citotoxicidad *ex vivo* mediados por células T CD33xCD3. Resumen de los valores de EC₅₀ para 8 anticuerpos biespecíficos CD33xCD3

ID de laboratorio biespecífico	EC ₅₀ de destrucción de células de AML primaria (nM)
C3CB11	3,958
C3CB12	2,635
C3CB7	0,3315
C3CB88	0,6722
C3CB103	4,186
C3CB102	4,973
C3CB97	~0,2316
C3CB189	0,5782

Ejemplo 6: Demostración de que los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 se unen a los dominios C2 de CD33 e inducen la citotoxicidad de las líneas celulares que expresan el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de CD33

Ensayos de citotoxicidad mediada por células T *in vitro* con anticuerpos biespecíficos CD33xCD3

Estudios recientes han demostrado que aproximadamente el 50 % de la población de AML presenta un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs12459419, lo que provoca la omisión del exón 2 de CD33, lo que resulta en la eliminación del dominio V de CD33. Este estudio también demostró que Mylotarg, que se une al dominio V de CD33, no tenía eficacia en los pacientes que expresan el SNP y, por lo tanto, reducía el riesgo de recaída y mejoraba la supervivencia en aproximadamente el 50 % de la población con AML (Lamba y col. 2017, JCO, CD33 Splicing Polymorphism Determines Gemtuzumab Ozogamicin Response in De Novo Acute Myeloid Leukemia: Report From Randomized Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531). Teniendo en cuenta los datos obtenidos con Mylotarg en el estudio mencionado anteriormente, se realizaron ensayos de citotoxicidad mediados por células T *in vitro* para evaluar si los aciertos de CD33 (C33B836 que se une a V frente a C33B904 que se une a C2) combinados con brazos de CD3 (CD3B219 o CD3B376) median la destrucción de las líneas celulares que expresan SNP rs12459419. En resumen, las células efectoras (células T de pan adquiridas en Biological Speciality) se recolectaron, se contaron, se lavaron y se resuspendieron a 1×10^6 células/ml en RPMI (Invitrogen) con un 10 % de medio celular FBS (Invitrogen). Las células diana (KG1, SH2 y OCIAML3) se marcaron con CFSE (Invitrogen) y se resuspendieron a 2×10^5 células/ml en RPMI con FBS al 10 %. Se eligieron KG1, SH2 y OCIAML3 para representar el tipo silvestre, heterocigoto y homocigoto para la mutación rs12459419 del SNP CD33, respectivamente. Los efectores y las células diana marcadas con CFSE se mezclaron en una relación efector:objetivo (E:T) = 5:1 en placas estériles de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron 10 µl de bloque Fc (fragmento ReoPro Fc) junto con una alícuota de 5 µL de anticuerpo biespecífico a cada pocillo que contenía diversas concentraciones. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 horas bajo 5 % de CO₂. Después de 48 horas, se añadió el regulador de tinción de células muertas en el infrarrojo cercano LIVE/DEAD® Fixable (Life Technologies) a las muestras y los cultivos se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, se lavaron y se resuspendieron en 100-200 ml de regulador FACs. La citotoxicidad inducida por el fármaco se determinó usando el citómetro de flujo CANTO II (BD Biosciences) y se analizó con el software FlowJo o el software Dive (BD Biosciences). La población de interés son las células CFSE+ vivas/muertas+ doblemente positivas. Como se muestra en la figura 3, a diferencia de los controles del grupo nulo (nulo x CD3B219 y nulo x CD3B376), los anticuerpos multiespecíficos de CD33xCD3 que se unen a V y a C2 indujeron la citotoxicidad celular redirigida de las células T del CD33+ WT para la línea celular de mutación KG1 del SNP rs12459419 a las 48 h. Por el contrario, a diferencia del C33B836 (C3CB97, C3CB7), solo el C33B904 que se une a C2 emparejó anticuerpos biespecíficos (C3CB189, C3CB88) que mediaron la citotoxicidad de las líneas celulares SH2 y OCIAML3 que eran heterocigotas u homocigotas para las mutaciones del SNP rs12459419, respectivamente. Por esta razón, los anticuerpos biespecíficos emparejados C33B904 (C3CB189, C3CB88) se llevaron a cabo para su posterior análisis y caracterización. En conjunto, estos datos sugieren que los anticuerpos biespecíficos que se unen al CD33 C2, tales como los anticuerpos biespecíficos emparejados C33B904, tienen el potencial de mostrar eficacia en un grupo más amplio de pacientes con AML que los anticuerpos anti-CD33 competidores que se unen al V.

Ejemplo 7: Reducción *ex vivo* mediada por CD33xCD3 de los picos de MOLM-13 y monocitos en un ensayo *ex vivo* de citotoxicidad de MOLM-13 en sangre entera

Para evaluar el potencial de citotoxicidad de los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 a la hora de eliminar los picos en las células MOLM-13 y los monocitos humanos normales, se utilizó un ensayo de citotoxicidad *ex vivo* con sangre entera humana sana normal con la línea celular de AML CD33+ MOLM-13 añadida de forma exógena. De manera similar al experimento anterior, se añadieron varios anticuerpos biespecíficos (anticuerpos CD33 emparejados con CD3B219 y CD3B376 del grupo CD3) a sangre entera diluida de 6 donantes humanos normales diferentes durante un período de 48 h sin proporcionar células T adicionales, ya que este ensayo se basa en la presencia de células T autólogas en la sangre del donante. Antes de la dilución, se enumeró la concentración de células T en la sangre de cada donante. A continuación, la sangre se diluyó con células MOLM-13 etiquetadas con CFSE (Invitrogen), de tal modo que la relación efector:objetivo (E:T) fuera de 1:5 para imitar la relación efector: objetivo en muestras de pacientes con AML. A las 48 h, las muestras se tiñeron con CD3 PerCPCy5.5, CD25 PE, CD33 FITC y CD14 Pacific Blue (todos los anticuerpos se adquirieron de Biolegend). A continuación, las muestras se lavaron al menos 3 veces en 1 regulador de lisis Lyse RBC (eBioscience). A continuación, las muestras se tiñeron con el regulador de tinción de células muertas en infrarrojo cercano LIVE/DEAD® Fixable (Life Technologies). El grado de citotoxicidad del tumor se determinó cuantificando primero las células CD33+ vivas en la fracción de monocitos CD14+ en presencia de los anticuerpos biespecíficos. La citotoxicidad de las células MOLM-13 se determinó enumerando el porcentaje de células CFSE+ muertas. La citotoxicidad de los monocitos se calculó como un porcentaje con respecto al PBS/control no tratado usando la siguiente ecuación: (% CD33+ CD14+ en PBS/control no tratado-% CD33+ CD14+ en muestra tratada)/(% CD33+ CD14+ en PBS/control no tratado). Los datos de la figura 4 indican que ambos anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 (el mismo C33B904 de derivación CD33 emparejado con cualquier brazo de CD3, CD3B376 y CD3B219) inducen específicamente la citotoxicidad celular de las células MOLM-13 y los monocitos CD33+ a las 48 h. Los controles del brazo nulo se usaron como controles de anticuerpos biespecíficos negativos. El grupo de control nulo mostró poca o ninguna actividad de citotoxicidad de los monocitos MOLM-13 y CD33+. Estos datos muestran los valores promedio de 6 donantes normales diferentes. Los valores promedio de EC₅₀ para la citotoxicidad de los monocitos MOLM-13 y CD14+ se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: Ensayos de citotoxicidad *ex vivo* mediados por células T CD33xCD3. Resumen de los valores de EC₅₀ para 2 anticuerpos biespecíficos CD33xCD3.

Ab ID biespecífico	EC ₅₀ de destrucción de MOLM13 (nM)	EC ₅₀ de destrucción de CD33 ⁺ CD14 ⁺ (nM)
C3CB189	0,1677	1,156
C3CB88	0,671	0,506

Ejemplo 8: Demostración de la reactividad cruzada entre especies de los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 a monos cynomolgus

Reducción de monocitos mediada por CD33xCD3 *ex vivo* en un ensayo de citotoxicidad *ex vivo* con sangre entera de cynomolgus

Para demostrar la reactividad cruzada funcional y evaluar el potencial de citotoxicidad de los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 a la hora de eliminar los monocitos de cynomolgus normales, se utilizó un ensayo de citotoxicidad *ex vivo* con sangre entera de cynomolgus sana. De manera similar al experimento anterior, se añadieron varios anticuerpos biespecíficos (anticuerpos CD33 emparejados con CD3B219 y CD3B376 del grupo CD3) a sangre entera diluida de 6 donantes de monos cynomolgus normales diferentes durante un período de 48 h sin proporcionar células T adicionales, ya que este ensayo se basa en la presencia de células T autólogas en la sangre del donante. A las 48 horas, las muestras se tiñeron con CD3 PerCPCy5.5, CD25 PE, CD33 FITC y CD14 Pacific Blue (todos los anticuerpos se adquirieron en Biolegend excepto el anticuerpo CD33 que se adquirió en Miltenyi); Bergisch Gladbach, Alemania). A continuación, las muestras se lavaron al menos 3 veces en 1 regulador de lisis Lyse RBC (eBioscience) antes de teñirlas con el regulador de tinción de células muertas en infrarrojo cercano LIVE/DEAD® Fixable (Life Technologies). El grado de citotoxicidad de los monocitos se determinó cuantificando primero las células CD33⁺ vivas en la fracción de monocitos CD14⁺ en presencia de los anticuerpos biespecíficos. La citotoxicidad se calculó como un porcentaje en relación con el PBS/control no tratado usando la siguiente ecuación: (% CD33⁺ CD14⁺ en PBS/control no tratado-% CD33⁺ CD14⁺ en muestra tratada)/(% CD33⁺ CD14⁺ en PBS/control no tratado). La activación de las células T se calculó como un porcentaje de los eventos de CD25⁺ en la fracción de CD3⁺. Los datos de la figura 5 indicaron que ambos anticuerpos biespecíficos de CD33xCD3 (el mismo C3B904 de derivación de CD33 emparejado con cualquiera de los brazos de CD3, CD3B376 y CD3B219) indujeron específicamente la citotoxicidad celular de los monocitos CD33⁺, así como la activación de las células T a las 48 h. Los controles del grupo nulo se usaron como controles de anticuerpos biespecíficos negativos y mostraron poca o ninguna citotoxicidad o actividad de las células T. La tabla 14 muestra los valores promedio de 6 donantes cynomolgus diferentes.

Tabla 14: Ensayos de citotoxicidad *ex vivo* mediados por células T CD33xCD3. Resumen de los valores de EC₅₀ para 2 anticuerpos biespecíficos CD33xCD3.

Id. de sec. de proteína AA	EC ₅₀ de destrucción de CD33 ⁺ CD14 ⁺ (nM)	EC ₅₀ de activación de células T (nM)
C3CB189	3,60	0,02
C3CB88	0,89	0,02

Ejemplo 9: Eficacia de C3CB189 y C3CB88 en xenoinjertos de AML humana con MOLM-13 en ratones NSG humanizados con células T

La eficacia de los C3CB189 y C3CB88 se evaluó en xenoinjertos de leucemia mieloide aguda (AML) humana con MOLM-13 diseminados transfectados con luciferasa establecidos en ratones hembra NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) humanizados con 20 millones de células T. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en un grupo de n = 10 mediante imágenes de bioluminiscencia en vivo (BLI) el día 5 después de la implantación del tumor por vía intravenosa. Los anticuerpos C3CB189 y C3CB88 a 0,005, 0,05 y 0,5 mg/kg o el control de anticuerpos NullxCD3 a 0,5 mg/kg se administraron por vía intravenosa cada 3-4 días durante 6 semanas.

El día 13 después de la implantación del tumor, cuando quedaban al menos ocho animales por grupo, se calculó la inhibición del crecimiento tumoral (% de TGI) determinada por bioluminiscencia. Se observó una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa con C3CB189 (figura 6) y C3CB88 (figura 8) en todas las concentraciones, en comparación con el control NullxCD3. El C3CB189 a 0,005, 0,05 y 0,5 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 76 %, el 100 % y el 82 %, respectivamente, y el C3CB88 a 0,005, 0,05 y 0,5 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 100 %, 100 % y 91 %, respectivamente, en comparación con los controles tratados con NullxCD3.

El tratamiento con C3CB189 y C3CB88 redujo la carga tumoral y aumentó la esperanza de vida (ILS) superiores a la mediana de supervivencia de 16 días del grupo de control con NullxCD3. Los animales tratados con C3CB189 tuvieron

una mediana de supervivencia de 19-27,5 días (figura 7) y los animales tratados con C3CB88 tuvieron una mediana de supervivencia de 26-28,5 (figura 9) días entre dosis. El C3CB189 a 0,005, 0,05 y 0,5 mg/kg dio como resultado un aumento de la vida útil del 19 %, el 72 % y el 50 %, respectivamente, y el C3CB88 dio como resultado un aumento de la vida útil del 63 %, 78 % y 72 %, respectivamente, en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 10: Demostración de la internalización de los anticuerpos CD33 en un ensayo de viabilidad celular conjugado con la proteína A *in vitro*

Se realizó un ensayo de viabilidad celular *in vitro* usando un conjugado farmacológico de proteína A precargado, el A-MMAF, para detectar la internalización de los anticuerpos diana unidos al ligando. Este ensayo funcional basado en células se realizó con un panel de anticuerpos anti-CD33, C33B782, C33B806, C33B836, C33B904, C33B937, y un anticuerpo de control de isotipo C33B9412 en una línea celular de AML MOLM13. El anticuerpo diana solo se probó como control en este ensayo para diferenciar la citotoxicidad debida a la internalización del anticuerpo y la citotoxicidad debida a la actividad de los anticuerpos de ensayo por sí solos. La figura 10 muestra la citotoxicidad con anticuerpos unidos a la proteína A-MMAF en MOLM13 después de 72 horas de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂. Se observó citotoxicidad dependiente de la concentración con los cinco anticuerpos CD33 en las células MOLM13, lo que sugiere la internalización de los cinco anticuerpos en esta línea celular. El anticuerpo de control de isotipo, C33B9412, no mostró una citotoxicidad significativa dependiente de la concentración, lo que sugiere una internalización específica del objetivo de estos anticuerpos CD33 en las células MOLM13. La tabla 15 muestra los valores de EC₅₀ para cinco (5) anticuerpos biespecíficos CD33xCD3.

Los resultados también indicaron que el anticuerpo C33B836 tiene una mejor internalización en las células MOLM13 que en otras.

Tabla 14: Ensayos de internalización de CD33. Resumen de los valores de EC₅₀ para cinco anticuerpos anti-CD33.

	C33B782	C33B806	C33B836	C33B904	C33B937	CNT09412
EC ₅₀ (nM)	0,88	0,22	0,04	0,96	1,92	

Ejemplo 11: Demostración de que los anticuerpos CD33 pueden mediar en la actividad de la ADCC

Para caracterizar la actividad de citotoxicidad mediada por células (ADCC) dependiente de anticuerpos de los mAb anti-CD33, se realizaron ensayos de ADCC *in vitro* usando células efectoras NK de donantes sanos y células diana de AML MOLM-13 y MV4-11. Células NK de donantes sanos (donantes CC00061 y M7015 de Biological Specialty Corporation; Colmar, PA) se sembraron en placas en el medio de cultivo MyelOcult H5100 (Stem Cell Technologies; Vancouver, California) suplementada con hidrocortisona 1×10^{-6} M (células madre), 7,5 ng/ml de IL-2 humana recombinante (R&D Systems; Minneapolis, MN), piruvato de sodio al 1 % (Life Technologies), 1 % de aminoácidos no esenciales (Life Technologies), 1 % de estreptomycin con penicilina (Life Technologies) 16-24 horas antes de iniciar los ensayos de ADCC. El día del ensayo, se marcaron 1×10^6 células/ml de células MOLM-13 y MV4-11 con 10 μ M de calceína AM a 37 °C durante 30 minutos. Tras el etiquetado, las células se lavaron tres veces para eliminar el exceso de calceína AM. Posteriormente, se incubaron 1×10^5 células diana MOLM-13 o MV4-11 marcadas con calceína AM durante 1,5 horas a 37 °C con células NK de donantes sanos (3×10^5) en presencia de concentraciones variables de anticuerpos anti-CD33. Las muestras de control de lisis máximas se generaron mediante la adición de Triton X100 a los pocillos de muestra de control designados a una concentración final del 0,5 %. La liberación de calceína AM se midió mediante fluorescencia a 485-535 nm con un lector de placas multimodo SpectraMax® M5 (Molecular Devices, LLC; Sunnyvale, California, EE. UU.). El porcentaje de lisis celular se determinó normalizando los datos a una lisis máxima (mediada por Triton X100) y mínima (células efectoras solas) usando la siguiente ecuación: % de lisis = [(Lisis experimental: lisis espontánea)/(lisis máxima: lisis espontánea)] *100.

Los anticuerpos IgG1 anti-CD33 con bajo contenido de fucosa indujeron la ADCC de una manera dependiente de la concentración (Figura 11). El C33B48.CLF demostró una actividad de ADCC más potente contra las células MOLM-13 y MV4-11 que el C33B912.CLF con valores de concentración media eficaz máxima entre 12 y 23 veces más altos (EC₅₀, tabla 16). La lisis máxima de las células MOLM-13 y MV4-11 en respuesta a C33B48.CLF y C33B912.CLF fue similar.

Tabla 16: Ensayos ADC CD33. Resumen de los valores de EC₅₀ para 2 anticuerpos anti-CD33 y 2 líneas celulares

	EC ₅₀ ADCC C33B48.CLF (nM)	EC ₅₀ ADCC C33B912.CLF (nM)
MOLM-13	0,023	0,292
MV4-11	0,113	2,008

Ejemplo 12: Características de unión del anticuerpo C3CB189 que se dirige al CD33, un antígeno expresado abundantemente por los blastocitos leucémicos.

El C3CB189 es un anticuerpo biespecífico 4-PAA de inmunoglobulina G (IgG) totalmente humano dirigido al complejo receptor CD3 en las células T y al CD33 en las células mieloides. El C3CB189 se une al (r)CD33 recombinante humano con una afinidad (K_d) de 0,89 pM y a rCD33 de cynomolgus (cynomolgus) con una afinidad (K_d) de 363 pM. El C3CB189 también se une al rCD3e humano y al mono cynomolgus con afinidades (K_d) de 151,32 y 43,83 nM, respectivamente. El C3CB189 se unió específicamente a las líneas celulares de AML que expresan CD33 KG-1, MOLM-13, Kasumi-1 y OCI-AML3 (figura 12). Como era de esperar, se observó un patrón de unión similar con el anticuerpo CD33xnull de control negativo, ya que contiene un único brazo Fab anti-CD33. Los anticuerpos biespecíficos de control negativo nullxCD3, así como nullxnull, no mostraron una unión significativa en estas células. Ninguno de los anticuerpos biespecíficos ensayados se unió a las líneas celulares CD33 negativas, CARNAVAL y KG-1ΔCD33, es decir, a las células KG 1 con delección genética de CD33 usando CRISPR (figura 12). Además, a diferencia de las células HEK-293T originales, las C3CB189, se unieron a las células HEK 293T que expresaban CD33 de cynomolgus, lo que demuestra una reactividad cruzada entre cynomolgus (figura 12).

Ejemplo 13: El C3CB189 mata las líneas celulares de AML CD33⁺ y activa las células T *in vitro*

A continuación, se utilizó un ensayo de citotoxicidad mediado por células T para evaluar la actividad del C3CB189 *in vitro* en varias líneas celulares, incluidas las líneas celulares CD33⁺, como MOLM-13, KG-1, SKNO-1, Kasumi-1 y OCI-AML3, así como líneas celulares de CD33^{nulas/bajas}, tal como CARNAVAL y KG-1ΔCD33. Los ensayos se realizaron con células T CD3⁺ panhumanas aisladas de seis donantes sanos y un bloqueador de la región cristalizable por fragmentos (Fc). Se añadió un bloqueador de Fc para prevenir el reclutamiento del C3CB189 mediado por Fc, ya que las mutaciones del PAA en la región Fc de la IgG4 no la hacen completamente silenciosa (Vafa y col., 2014) y porque los receptores Fc gamma (FcγR) se expresan con frecuencia en las células de la AML (Ball y col., 1989).

Como se ve en la figura 13, el C3CB189 demostró una citotoxicidad mediada por células T de líneas celulares de AML CD33⁺ cuando se combinó con células T purificadas después de 48 horas (figura 13). La mediana de la concentración eficaz semimáxima (EC₅₀) [así como los valores de EC₂₀] para MOLM-13, KG-1, Kasumi-1 y OCI-AML3 fue de 0,1307 [0,0283], 0,1677 [0,0525], 0,05 [0,0366] y 0,1826 [0,0844] nM, respectivamente (Figura 2B). No se observó citotoxicidad con las líneas celulares CD33 negativas CARNAVAL y KG-1ΔCD33 ni con los anticuerpos biespecíficos de control (nuloxCD3 o CD33xnull); véase la figura 13). Confirmamos que las células KG1ΔCD33 podrían, de hecho, ser el objetivo de las células T, realizando ensayos de citotoxicidad con un anticuerpo biespecífico CD123xCD3 (figura 14A).

El grado de activación de las células T inducida por el C3CB189 en presencia de líneas celulares tumorales CD33⁺ también se evaluó *in vitro* en los ensayos de citotoxicidad, midiéndose la expresión de CD25 como indicador de la activación. Como se muestra en la figura 2C, el C3CB189 indujo la activación de las células T cuando se incubó con líneas celulares tumorales CD33⁺ y células T pan-T de donantes sanos, mientras que se observó una activación mínima o nula de las células T con las células CD33⁻ CARNAVAL y KG-1ΔCD33. La mediana de los valores de EC₅₀ [EC₂₀] para MOLM-13, KG-1, Kasumi-1 y OCI-AML3 fue de 0,0283 [0,0077], 0,0664 [0,0256], 0,0432 [0,0267] y 0,0500 [0,0178] nM, respectivamente (figura 15C). El C3CB189 no provocó la activación de las células T en ausencia de células diana, lo que demuestra la especificidad de la activación de las células T (figura 14B). El anticuerpo de control CD33xnull no indujo la activación de las células T en ninguna línea celular. El anticuerpo de control nullxCD3 indujo la activación de las células T a las concentraciones más altas de 533 y 53 nM en presencia de líneas celulares CD33⁺ y CD33⁻, pero no logró mediar la activación con ninguna otra dosis. Es importante destacar que el C3CB189 mostró una inducción específica de la activación de las células T, solo en presencia de líneas celulares CD33⁺ y no en presencia de líneas celulares CD33⁻ (figura 15A) o cuando las células T se incubaron en ausencia de células diana (figura 14B).

Por último, las respuestas de las citocinas también se evaluaron en el ensayo de redirección de células T *in vitro* anterior con la línea celular Kasumi-1. El C3CB189 provocó la secreción de varias citocinas, como el interferón gamma (IFN-gamma), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleucina (IL) -2 y la IL-8 (Figura complementaria 3). Estos datos son consistentes con los datos de citotoxicidad y activación de las células T mostrados en las figuras 13 y 15A-15C. En la tabla 17 se presenta un resumen de mediana de EC₅₀ y la concentración que produce el 20 % de los valores de efecto máximo posible (EC₂₀) para las respuestas de las citocinas.

Tabla 17. Valores de concentración eficaces para la liberación de citocinas mediada por C3CB189 en un ensayo de redirección de células T con células T purificadas y células diana Kasumi-1. Los valores de la CE están en nM. n representa el número de donantes de un total de 6 para los que se pueden determinar los valores de la CE.

Citocina	n	Mediana de EC ₂₀	Mediana de EC ₅₀	Mediana de EC ₉₀
IFN-gamma	6	0,048	0,16	1,409
IL-1beta	6	0,013	0,045	0,226
IL-2	4	0,090	0,346	5,282
IL-4	4	0,054	0,078	0,153
IL-8	6	0,015	0,042	0,246

Citocina	n	Mediana de EC ₂₀	Mediana de EC ₅₀	Mediana de EC ₉₀
IL-10	6	0,052	0,123	1,271
IL-13	5	0,008	0,034	0,103
TNF-alfa	6	0,049	0,208	3,530

Ejemplo 14: El C3CB189 muestra una actividad antitumoral eficaz *in vivo*

Se evaluó la función del C3CB189 en dos modelos tumorales de xenoinjerto establecidos en ratones NSG humanizados con células T. En ratones portadores de tumores subcutáneos establecidos KG-1, el tratamiento con C3CB189 a 0,1, 0,5 y 1 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento del tumor del 41 %, 92 % y 87 %, respectivamente, en comparación con los animales de control tratados con nullxCD3 ($p < 0,0001$ para 0,5 y 1 mg/kg, figura 16A). El C3CB189 a 0,5 y 1 mg/kg también dio como resultado 6 y 7 respuestas completas el día 55, respectivamente.

En el modelo establecido que expresa la luciferasa diseminada que expresa MOLM-13 (MOLM-13-luc), el tratamiento con C3CB189 se inició después de confirmarse la localización de las células de la AML en la médula ósea (BM) tras la inyección intravenosa. El C3CB189 a 0,005, 0,05 y 0,5 mg/kg que se administró cada 3 a 4 días inhibió significativamente el crecimiento tumoral según lo evaluado por bioluminiscencia (76 %, 100 % y 82 %, respectivamente) en comparación con los ratones tratados con el control nullxCD3 (figura 17). La administración de C3CB189 a 0,005, 0,05 y 0,5 mg/kg produjo un aumento estadísticamente significativo de la esperanza de vida del 19 %, 72 % y 50 %, respectivamente ($p < 0,0001$, Figura 16B), en correlación con una carga tumoral reducida en la médula ósea, la columna vertebral y las extremidades traseras, como se observó mediante bioluminiscencia (Figura 16C). Al final del estudio, el día 55, tres animales tratados con C3CB189 a 0,05 mg/kg mostraron una respuesta completa según lo evaluado por BLI.

Además, los ratones portadores de tumores MOLM-13-Luc tratados con C3CB189 a 0,05 mg/kg y, en menor medida, a 0,005 mg/kg, mostraron una disminución de las células tumorales y un aumento de la infiltración de células T CD3⁺ en la médula ósea, según lo medido mediante citometría de flujo (figura 16D), y un aumento de la infiltración de células T CD8⁺ mediante IHC (figura 3E) el día 11. Estos datos son relevantes, ya que el BM suele ser un sitio de resistencia para las células madre leucémicas (LSC) en la AML y de persistencia de una enfermedad residual mínima. En conjunto, estos datos demuestran que el C3CB189 inhibe el crecimiento tumoral de dos modelos de tumores de AML al reclutar células T en el sitio del tumor en ratones humanizados con células T.

Ejemplo 15: El C3CB189 media en la citotoxicidad de las células de la AML con picos de sangre entera sana, así como en los blastocitos de la AML de muestras de pacientes primarios.

Se informa que el dominio extracelular (ECD) de CD33 se desprende de las células; por lo tanto, las muestras normales y de pacientes podrían contener CD33 soluble (sCD33). Un estudio mostró que se detectan aproximadamente de 4 a 30 ng/ml de sCD33 en el plasma de pacientes con AML (Biedermann, B., Gil, D., Bowen, D. T. y Crocker, P. R. (2007). Leuk Res 31, 211-220.). Este valor es mayor que la concentración de 0,6-5,8 ng/ml determinada en suero humano sano (Biedermann, B., Gil, D., Bowen, D. T. y Crocker, P. R. (2007). Leuk Res 31, 211-220.).

Para determinar los niveles fisiológicos de sCD33 en donantes normales y de AML, se desarrolló un ensayo de espectrometría de masas (MS) acoplada a inmunocaptura. El análisis de las muestras de suero normal y de AML mostró niveles medios de sCD33 similares de 53,03 ng/ml (1,91 nM) y 52,90 ng/ml (1,90 nM), respectivamente (Tabla 18).

Tabla 18: Evaluación de los niveles de sCD33 en muestras de pacientes normales y con AML. Se analizaron muestras de suero humano sano y de AML (n = 20/cada una) para determinar los niveles de sCD33 mediante espectroscopía de masas.

Muestra	Concentración (nM)	Concentración (ng/ml)
Individuo 1	0,23	6,15
Individuo 2	NR	NR
Individuo 3	NR	NR
Individuo 4	0,21	5,59
Individuo 5	NR	NR
Individuo 6	0,25	6,73
Individuo 7	0,24	6,39
Individuo 8	NR	NR

Suero de donantes de AML (AML)	Individuo 9	0,23	6,14
	Individuo 10	0,21	5,69
	NHS medio (reportable)	0,23	6,12
	Donante de AML 1	0,14	3,76
	Donante de AML 2	0,14	3,71
	Donante de AML 3	NR	NR
	Donante de AML 4	0,15	3,92
	Donante de AML 5	0,16	4,32
	Donante de AML 6	0,13	3,61
	Donante de AML 7	NR	NR
	Donante de AML 8	0,17	4,44
	Donante de AML 9	0,14	3,81
	Donante de AML 10	NR	NR
	AML medio (reportable)	0,15	3,94

Para evaluar la actividad del C3CB189 en un entorno más relevante desde el punto de vista fisiológico, realizamos ensayos de citotoxicidad mediados por células T usando sangre entera periférica humana como fuente de células T efectoras, añadiendo varias células tumorales CD33⁺ como dianas e incubadas durante 48 horas. El C3CB189 indujo la citotoxicidad mediada por células T de las células CD33⁺ MOLM-13 y Kasumi-1, con mediana de valores de EC₅₀ [EC₂₀] de 0,111 [0,054] y 0,124 [0,06] nM, respectivamente (figura 17). Similarmente, el C3CB189 condujo a la activación de las células T (como lo indica el CD25), las células MOLM-13 y las células Kasumi-1, con mediana de valores de EC₅₀ [EC₂₀] de 0,037 [0,017] y 0,085 [0,039] nM, respectivamente (figuras 18A y 18B). La activación medida de las células T mediada por C3CB189 representa la activación total de las células T en la sangre y refleja la activación relacionada con la destrucción tanto de las células tumorales CD33⁺ exógenas como de los posibles leucocitos periféricos CD33⁺ endógenos, tales como los neutrófilos y los monocitos, cuya citotoxicidad no se midió en este ensayo. Además, estos datos sugieren que el C3CB189 media en la destrucción de las células tumorales a pesar de la presencia de niveles basales de sCD33 y otros leucocitos CD33⁺ en la sangre total.

La capacidad del C3CB189 para inducir citotoxicidad en un contexto más relevante desde el punto de vista clínico se evaluó a continuación en un ensayo de citotoxicidad *ex vivo* con sangre entera de donantes de AML. Este sistema se basa en la presencia de células T autólogas en la sangre del propio paciente para destruir las células de la AML. Se midió el grado de citotoxicidad mediada por células T de las células CD33⁺ y la activación de las células T. El C3CB189 indujo una citotoxicidad dependiente de la concentración de los blastos CD33⁺ (figura 19A) que también se correlacionó con el aumento de la activación de las células T (figura 19B) en las 6 muestras de pacientes. La citotoxicidad máxima inducida por el C3CB189 fue de aproximadamente el 60 % de los blastos CD33⁺. El anticuerpo de control del brazo nulo indujo una citotoxicidad y una activación de las células T. El C3CB189 indujo la citotoxicidad y la activación de las células T, lo que dio como resultado valores de EC₅₀ que oscilaron entre 0,052 y 9,52 nM (mediana: 0,365 nM) y 0,03 a 5,109 nM (mediana: 0,355 nM), respectivamente (figuras 19A y 19B). Estos datos indican que el C3CB189 fue eficaz para destruir las células AML CD33⁺ en un entorno *ex vivo* más fisiológico y en presencia de niveles basales de sCD33.

Ejemplo 16: Evaluación de la reactividad cruzada de Cynomolgus para C3CB189

Para evaluar si el mono cynomolgus (cynomolgus) era un modelo apropiado para evaluar la actividad del C3CB189, primero investigamos mediante análisis FACS la expresión de CD33 en leucocitos obtenidos de 6 monos cynomolgus sanos. Se descubrió que las células T y B en la sangre periférica de los monos cynomolgus tenían niveles de expresión de CD33 de bajos a cero (figura 20). Aproximadamente del 75 al 96 % de los neutrófilos de cynomolgus expresaron CD33 a una densidad antigénica media de 7.545 moléculas/célula (figura 20). Por otro lado, el porcentaje de monocitos de cynomolgus CD33⁺ fue variable entre los 6 donantes, oscilando entre el 0 % y el 84 % con una densidad media de antígenos de 2.146 moléculas por célula (figura 20).

Después, para demostrar la reactividad cruzada de los cynomolgus y para evaluar el potencial de citotoxicidad del C3CB189 al eliminar los monocitos y neutrófilos normales de los monos cynomolgus, realizamos ensayos de citotoxicidad *ex vivo* usando sangre entera de monos cynomolgus sanos con células CD33⁺ MOLM-13 añadidas de forma exógena. En este sistema, también se monitorizó el agotamiento de los monocitos de mono cynomolgus normales CD33⁺ y de los neutrófilos de mono cynomolgus normales, junto con la activación de las células T. De hecho, el C3CB189 medió la destrucción de células CD33⁺ MOLM-13 (EC₅₀: 0,013-0,452 nM) junto con monocitos de mono cynomolgus normales CD33⁺ (EC₅₀: 0,625-5,636 nM) y neutrófilos normales del mono cynomolgus (EC₅₀: 0,013-0,714 nM) *in vitro* después de 48 horas de incubación *ex vivo* (figura 21). El control nullxCD3 mostró una citotoxicidad limitada de todas las células diana CD33⁺ y mostró la activación de las células T solo a la dosis más alta de 533 nM. En conjunto, estos datos muestran la reactividad cruzada funcional del mono cynomolgus con el C3CB189 y establecen

que los monocitos y neutrófilos de cynomolgus CD33⁺ son posibles marcadores farmacodinámicos (PD) en estudios con primates no humanos. Estos datos también muestran que el C3CB189 puede mediar en el agotamiento de una línea celular de AML humana por células T de cynomolgus. Es importante destacar que estos resultados validan al mono cynomolgus como un modelo de eficacia apropiado para el C3CB189.

Ejemplo 17: El C3CB189 media en la reducción de los leucocitos CD33⁺ en monos cynomolgus

Para evaluar la farmacocinética (PK) y la farmacodinámica (PD) del C3CB189 *in vivo*, el C3CB189 se administró como una dosis intravenosa única a monos cynomolgus. Los perfiles de PK se muestran en la figura 22A. El C3CB189 mostró las características farmacocinéticas de un anticuerpo monoclonal (mAb) típico con una PK aproximadamente lineal en el intervalo de dosis de 0,05 a 1 mg/kg. La depuración total media estimada del C3CB189 fue de 13,03 a 21,39 ml/día/kg, el volumen de distribución fue de 89,14 a 154,91 ml/kg y la semivida terminal fue de 4,20 a 5,06 días. Se observó una eliminación aparentemente acelerada del C3CB189 después del día 10 en los animales del grupo de dosis de 1 mg/kg. Lo más probable es que esto esté relacionado con el desarrollo de anticuerpos antifármacos (ADA, por sus siglas en inglés), aunque la ADA no se probó en este estudio.

Según el mecanismo de acción previsto, se observaron aumentos dependientes de la dosis en la activación de las células T (%CD25⁺) después de una dosis intravenosa única de C3CB189, observándose un máximo del % de CD25⁺ en los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺/CD4⁻) en el primer punto temporal 24 horas después de la dosis (figura 22B). Los linfocitos T auxiliares (CD4⁺/CD8⁻) también mostraron perfiles de activación similares (% CD25⁺) después de la administración de C3CB189 (datos no mostrados). La administración de C3CB189 también resultó en un aumento dependiente de la dosis en las concentraciones plasmáticas de las citocinas que se estaban analizando (IFN γ , IL-10, IL-2, IL-6, MCP-1 y TNF α) 2 horas después de la dosis (figura 23). Con la excepción de la IL-10 y la MCP-1, las citocinas volvieron a estar por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) 24 horas después de la dosis.

La administración de dosis relacionadas con el C3CB189 condujo a una reducción sostenida de los granulocitos CD33⁺ (neutrófilos). Según los niveles más bajos de expresión de CD33 en los monocitos, también se observó una reducción más transitoria en los monocitos CD33⁺. Los perfiles de concentración-tiempo para granulocitos y monocitos se muestran en la figura 22C y la figura 22D, respectivamente. Si bien la rápida desaparición inicial de los granulocitos y monocitos de la sangre periférica podría estar relacionada con la marginación transitoria de los leucocitos asociada a la activación de las células T, la reducción de las poblaciones de granulocitos/monocitos CD33⁺ fue mucho más sostenida. En particular, la reducción de las poblaciones de granulocitos continuó en un nivel cercano al máximo hasta el día 8, y se recuperó gradualmente después de eso. El rebote de los monocitos ocurrió antes y fue más prominente.

El C3CB189 también se estudió en otros dos estudios con monos cynomolgus tras múltiples administraciones intravenosas a niveles de dosis que oscilaban entre 0,01 mg/kg y 30 mg/kg. Los cambios relacionados con el C3CB189 fueron generalmente consistentes con los observados después de una dosis única y el C3CB189 se toleró bien a estos niveles de dosis (datos no mostrados). En conjunto, estos datos proporcionan evidencia de la actividad mediadora del C3CB189 al tiempo que mantienen la tolerabilidad en monos cynomolgus.

Ejemplo 18: Citotoxicidad mediada por C3CB189 de líneas celulares CD33⁺ y muestras de pacientes independientemente de los genotipos del SNP rs12459419

Un SNP, rs12459419 (C>T; Ala14Val en el exón 2) se produce dentro de un sitio de empalme regulador de CD33, en el que un alelo T produce un aumento de la expresión de los transcritos que se prevé que codifican una isoforma de la proteína CD33 que carece del dominio del conjunto V. Los datos recientes demostraron además que los sujetos con el genotipo SNP rs12459419 CC (aproximadamente 50 % de los participantes en el estudio) tenían un riesgo significativamente menor de recaída y una mejor supervivencia sin episodios (EFS) y sin enfermedad después del tratamiento con GO, mientras que este beneficio no se observó en los pacientes con los genotipos CT o TT (Lamba, J. K., Chauhan, L., Shin, M., Loken, M. R., Pollard, J. A., Wang, Y. C., Ries, R. E., Aplenc, R., Hirsch, B. A., Raimondi, S. C. y col. (2017). *J. Clin. Oncol* 35, 2674-2682.). Dados los datos con GO en el estudio mencionado anteriormente, evaluamos el impacto de los genotipos SNP-rs12459419 en la actividad del C3CB189. Primero confirmamos mediante el mapeo de intercambio de hidrógeno y deuterio (HDX) que el C33B904 (versión IgG₄ del brazo parental CD33 del C3CB189) se une a distintas regiones en el dominio C2 (IgC en la figura 24A) de CD33 y no tiene unión en la región V (IgV en la figura 24A). Por el contrario, el C33B836 (versión IgG₄ del brazo parental CD33 de C3CB97) se une al dominio V del CD33 y no tiene unión en la región C2 de CD33. A continuación, utilizamos ensayos de citotoxicidad mediados por células T *in vitro* para comparar las respuestas mediadas por C3CB97 (aglutinante V) con C3CB189 (aglutinante C2). Basados en los datos de genotipado (figura 25A), se eligieron KG-1, SH2 y OCI-AML3 para representar la CC de tipo silvestre, la CT heterocigótica y la TT homocigótica para la mutación rs12459419 del SNP CD33, respectivamente. A diferencia del control nullxCD3, los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 que se unen a V y C2 indujeron la citotoxicidad celular redirigida por las células T de la línea celular CD33⁺ KG-1 “CC” a las 48 h (Figura 6B). Por el contrario, a diferencia del C3CB97, que se une a V, solo el C3CB189 que se une a C2 medió la citotoxicidad de la línea celular SH2 “CT” y las líneas celulares OCI-AML3 “TT”, mientras que no se observó actividad para el aglutinante en V C3CB97.

Después, se realizaron ensayos de citotoxicidad *ex vivo* usando sangre entera de pacientes con AML para ampliar y confirmar nuestras observaciones anteriores. Basado en los datos de genotipado, las muestras de los pacientes 6095, 6116 y 6152 se identificaron como del genotipo CC, mientras que las muestras de los pacientes 6129 y USAML0078 se identificaron como CT heterocigóticas para el SNP de CD33 rs12459419, respectivamente (figura 25B). No se identificó ninguna muestra como TT homocigótica para el SNP de CD33 rs12459419. Los anticuerpos biespecíficos CD33xCD3 que se unen a V y a C2 indujeron de hecho una citotoxicidad comparable a las células T redirigidas a las células T en muestras de AML que se identificaron como genotipo CC; Por el contrario, el C3CB189 que se une a C2 mostró una mayor citotoxicidad de las muestras de AML que eran heterocigotas (CT) para la mutación rs12459419 del SNP, en comparación con el C3CB97 de unión a V (figura 24B). A continuación, dado que el SNP rs12459419 es una mutación de la línea germinal, realizamos experimentos *ex vivo* similares con monocitos purificados y células T autólogas compatibles de 25 donantes sanos diferentes. Los datos de genotipado de los 25 donantes se muestran en la figura 25C. Según el hecho de que el C3CB189 se une al dominio C2 de CD33, el C3CB189 medió la citotoxicidad de los monocitos humanos primarios independientemente de su estado de genotipo de SNP (véase la figura 24C). Por el contrario, el C3CB97 que se une al V medió una citotoxicidad limitada o nula cuando las muestras fueron CT o TT para el SNP rs12459419. En conjunto, estas tres líneas de evidencia sugieren que el C3CB189 podría demostrar su eficacia en un grupo más amplio de pacientes con AML al atacar el epítipo C2 conservado.

Tabla 19: Secuencias de región variable de cadena pesada

HC ID	ID	Secuencia de aminoácidos
B23H1	256	QITLKESGPTLVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDD KRYNPSLKSRLTITKDTSKNQWLTMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWGQGLTVTVSS
CD3H141	257	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLTVTVSS
CD3H219	258	QVQLQQSGPRLVLRPSQTLSTLCAISGDSVFNNNAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRS KWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYWGQGLTVTVSS
C33H42	259	QLQLQESGPGLVNPSETLSHTCTVSGGSISSSSHYWGWIRQPPGKGLEWIGKIYYSGN TYYNPSLKSRLTISIDTSKNQFSLKMSSVTAADTAVYYCARLADVWPAAARYFDSWGQGLTVTV SS
C33H44	260	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWRQSPSRGLEWLGRTYYRS KWYNDYAVSVRSRHTNPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYHCARETMFRGLMDYWGQGLTVTV SS
C33H45	261	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCLASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVTSYDGS NKYCADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRSLDWLPDSTSYDGMVDV WGQGTITVTVSS
C33H46	262	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTN TGNPTYAQAFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDREVRDYWGQGLTVTVSS
C33H48	263	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIIRSTNYWGWIRQPPGKGLEWIGTIYYSGN TYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLADVWPAAARYFDYWGQGLTVTV SS
C33H49	264	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGFYWGWIRQPPRKGLEWIGTIYYSGN TYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARLADWWPAARYFDNWGQGLTVTV SS
C33H51	265	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGRYYWGWIRQPPGKGVWIGNIYYSGN TYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARLGLSLVWPAAMSFYWGQGLTVTV SS
C33H52	266	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGYWGWVRQPPGKGLEWIGSIYSSGN TYYNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTALYYCARLGLSLVWPAAMSFYWGQGLTVTV SS
C33H55	267	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTLCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGRGLEWIGEIYHSGN TNNPSLKSRLTISADKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARIIAVARYFDSWGQGLTVTVSS
C33H65	268	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCLASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVWISYDGS SNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRDFDLWLPDSTSYHGMDV WGQGTITVTVSS
C33H66	269	QVQLVESGGGWQPGRLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS SNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCAKDFRDFDLWLPDSTSYHGMDV WGQGTITVTVSS

ES 2 998 890 T3

HC ID	ID	Secuencia de aminoácidos
5	C33H68	270 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLNWVSAIDYSGN DTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKESQLLHGLFEHWGQGGLVTVSS
	C33H69	271 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLDWIGSINYSGS TYYNPSLKS RVTISVDTSKIQFSLKLRSVTAADTAVYYCARLDGYESPFDYWGQGGLVTVSS
10	C33H70	272 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSSGN TYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLGS LVPAAMSF DYWGQGGLVTVSS
	C33H72	273 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQHG SEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGGLVTVSS
15	C33H73	274 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASRFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSTINISGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKGGYSSGPF DYWGQGGLVTVSS
	C33H74	275 QVQLVESGGGWQPG RSLRLS CAASRFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVHYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDV WGQGTTVTVSS
20	C33H76	276 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYNSGYDGD F DYWGQGGLVTVSS
	C33H78	277 QVQLVESGGGVVQPG RSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRYFDWLPPDSSSYGMDV WGQGTTVTVSS
25	C33H80	278 QVQLVQSGSELRKPGASVKVSC KASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTN TGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSSAYLQISSLKAEDTAMYYCATDRDRGTDYWGQGGLVTVSS
	C33H81	279 QVQLVESGGGWQPG RSLRLS CAASGFTFSAYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYAD S VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTV TVSS
30	C33H84	280 QVQLVESGGGVVQPG RSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSTSYGMDV WGQGTTVTVSS
	C33H87	281 EVQLVESGGGFVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQHG SEKYYVDSVKGRFTISRDN VKNSLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGGLVTVSS
35	C33H88	282 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSC KASGYTLTRSAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTN TGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLLISSLKTEDTAVYYCASDILPGYHEDYWGQGGLVTVS S
	C33H90	283 QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRS KWYNDYALSVQSRITINPDT SKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVAVAASFDYWGQGGLVTVS S
40	C33H91	284 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSRSYH WGWIRQPPGVGLEWIGSIYYTGS TYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLADIVPAARYFDYWGQGGLVTV SS
	C33H92	285 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSSSYWGWIRQPPGKGP EWIGSIYSSGNT YYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLISMTAADTAVFYCARLAATIVVPAARYFDCWGQGGLVTVS S
45	C33H98	286 EVQLVESGGGFVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQHG SEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGGLVTVSS
	C33H99	287 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMTWVRPAPGKGLEWVANIKRDG GEKYYVDSVKGRFTISRDN AANSLYLQMNSLRVEDTAVYYCARPFYDHF DYWGQGGLVTVSS
50	C33H108	288 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSC KASGYTFSTYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTN TGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRLDRGTDYWGQGGLVTVSS
	C33H249	289 EVQLVESGGGLVQPG RSLRLS CVASGFTFDDYAIHWVRQAPGKGLEWVSGLSWNG GNIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLKTEDTAFYYCTKDTPYGDYFDYWGQGGLVTVS S
55	C33H250	290 EVQLVESGGGLVQPG RSLRLS CAGSGFTFDDYAIHWVRQAPGKGLEWVSGLSWNG GNIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQLNSLKTEDTAFYYCAKDS PYGDYFDYWGQGGLVTVSS
60		
65		

HC ID	ID	Secuencia de aminoácidos
5	C33H251	291 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIGWSG GSIVYADSVKGRFKISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSPLYGDFFDYWGQGLTVTS S
	C33H252	292 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIGWSG GSIVYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSPLYGDFFDYWGQGLTVTS S
10	C33H253	293 EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA1NGYGD GRYYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYSCAKDQGFGEFFDYWGQGLTVTS S
	C33H254	294 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPDKGLEWVAVIWFDDG NNKYYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRELLFDYWGQGLTVTVSS
15	C33H255	295 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPGEGLWVSGISWNG GDMVYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCVKDMPIYDFLTGSDYIIYGM VWGQGTITVTVSS
20	C33H256	296 QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYVG SHKYYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSLCFDYWGQGLTVTVSS

Tabla 20: Regiones variables de cadena ligera

LC ID	ID	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
25	B23L3	297 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSYNGISYMHYQQKPGQPPKLLIYAASN PESGVPDRFSGSGSGTOFTLTISSLQAEDVAVYYCQNEPWFQGGTKVEIK
	CD3L66	298 QTWTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
30	CD3L150	299 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFSWYQQHPDKAPKVLLEYVSKRPS GVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL
	C33L8	300 SYELTQPPSVSVSPGQTASNCSGDKLGKDYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
35	C33L10	301 SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNSIGSKSVHWYQQKPGQAPVMVYDDSDRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSTVVFQGGTKLTVL
	C33L11	302 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKDYACWYQQKPGQSPVWIYQDSKRPSGIP ERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
40	IAPL24	303 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKDYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
	C33L58	304 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKDYACWYQQKPGQSPVLVIYQDYKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
45	C33L59	305 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKDYACWYQQKPGQSPVLVIYQDYKRPSG1P ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
	C33L34	306 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKDYACWYQLRPGQSPVLVIYQDSNRPSGIPE RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
50	N46L109	307 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKDYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
	C33L42	308 SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGIKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPPGI PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSTVVFQGGTKLTVL
55	C33L47	309 SYELTQPPSVSVSPGQTASMCSDGDKLGKDYACWYQQKPGOSPVMYQDRKRPSGIP ERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL
	C33L60	310 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKDYACWYQQKPGQSPVLVIYQDGKRPSGIP ERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRNTVVFQGGTKLTVL
60	C33L17	311 DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKAGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEEDVAVYYCQYYGTPWTFQGGTKVDIK
	C4LL152	312 DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEEDVAVYYCQOANSFPFTFGPGTKVDIK
65	C33L40	313 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGAKFASWYQQKPGQSPVLVIYQDNKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAWDSSTVVFQGGTKLTVL

LC ID	ID	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
5	C33L32	SYELTCWSVSVSPGQTASRTCSCGMCLGDKYVRWYQQKTGQSPVLVMYQDSKRPSGI RERFYGSNSGNTATPTISGTQAVDEAEYYCQAWDSSTGWFGGGTKLTVL
	C33L38	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAONQQKPGQSPVLVIYQDNKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLNSGTQAMDEADYYCQAWGRNTVVFGGGTKLTVL
	C33L39	QSALTWASVSGSPGQSIPISTGTSSDDGKNNIVSWYQQHPGKAPKLMTYKDSKRPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEADYHCCSYAGASNHWFGGGTKLTVL
10	C33L57	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGNKYACWYQQKPGQSPWWYQDRKRPSGI PERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTWFGGGTKLTVL
15	C33L73	QSALTQPASVSGSPGQSMCTGTSSDVGDNYSWYQQHPGKVPKLMYDVSNR SGVSNRFSGSMGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSSALEVFGGGTKLTVL
	C33L53	SYELTQPPSVSVSPGQTASICSGLDKGDKYACWYQQKPGQSPVLVTYQDNKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSNTVVFGGGTKLTVL
	C33L66	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVWIHQDRKRPSGIP ERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
20	C33L35	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDTRKRPSGIP ERVSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYHCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
25	C33L61	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGINSVDVGSYDLVSWYQQHPGKAPKLLIYDGSERPS GVFGRFSGSKSDNTTSLTISGLQAEDEAAYYCCSYEVTTTYVFGGGTKLTVL
	C33L51	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSXUWSQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYOOVWDSNSDHVVTGGGTKLTVI
	C33L44	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVTYQDSNRPSGIP ERFSGSNSGNTAILTISETQAMDEADYYCQAWDSSTYVFGTGTKVTVL
30	C33L30	SYELTQPPSVSVSPGQTVSISCSGDLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTOAMDEADWCQAWDSSTYXTGTGTKVTVL
35	C33L69	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
	C33L37	SYVLTQPPSVAVAPGQTARITCGGSNIGKISVHWYQQKAGQAPVLVHDDRARPSGI PERLSGSNSGTTATLTISRVEVGDEADYYCQVWNSSSVHPVFGGGTKLTVL
	C33L74	QSALTQPASVSGSPGQSMCTGTSSDVGDDNYVSWYQQIIPGKAPKLMYDVSNR SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCSSYSSSTTLEVFGGGTKLTVL
40	C33L115	DIQMTQSPSSVWASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQQPGKAPNLLIYRSSSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNSFPYTFGQGTKEIK
45	C33L116	DIQMTQSPSSVWASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSWQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNSFPYTFGQGTKEIK
	C33L117	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISWA STRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYSTPYTFGQGTKEIK
	C33L118	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISWA STRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYSTPYTFGQGTKEIK
50	C33L119	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYCCQQYNSYPWTFGQGTKEIK
55	C33L120	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDMYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQTWDTRIAVFGGGTNLTVL
	C33L121	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGNEHVCWYHQKPGQSPVLVIYQNNKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQATDEADYYCQAWDSTTAVFGGGTKLTVL
	C33L122	SYELTQPPSVSVSPGQTANISCSGVTLGYNAYWYQQKPGQSPILVISQDTQRPSGI ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQAWDITVLFGGGTKLTVL
60	C33L132	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDGKRPSGIP ERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCOAWDRNTWFGGGTKLTVL
	C33L41	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTWFGGGTKLTVL

Tabla 21: Secuencias de CDR1-3 de cadena pesada

ES 2 998 890 T3

	HC ID	ID	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
5	B23H1	256	GFSLSTSGM	339	YWDDD	340	LYGFTYGFA	341
	CD3H141	257	GFTFNTY	342	RSKYNNYA	343	HGNFGNSYVSWFA	344
	CD3H219	258	GDSVFNNNA	345	YYRSKWL	346	GYSSSFD	347
10	C33H42	259	GGSISSSSH	348	YYSGN	349	LADV VVVPAARYFD	350
	C33H44	260	GDSVSSNSA	351	YYRSKWY	352	ETMFRGLMD	353
	C33H45	261	GFTFSSY	354	SYDGSN	355	DFRSLDWLPPDSTSYDGMD	356
15	C33H46	262	GYTFTNY	357	NTNTGN	358	DREVRD	359
	C33H48	263	GGSIIRSTNY	360	YYSGN	361	LADV VVVPAARYFD	362
	C33H49	264	GGSISSSGF	363	YYSGN	364	LADV VVVPAARYFD	365
20	C33H51	265	GGSISTGRY	366	YYSGN	367	LGSLVVVPAAMSFD	368
	C33H52	266	GGSI RGSSY	369	YSSGN	370	LGSLVVVPAAMSFD	371
	C33H55	267	GGSISSSN	372	YHSGN	373	IIAVARYFD	374
25	C33H65	268	GFTFSSY	375	SYDGSN	376	DFRDFDWLPPDSTSYHGMD	377
	C33H66	269	GFTFSSY	378	SYDGSN	379	DFRSFDWLPPDSASYHGMD	380
	C33H68	270	GFTFSGY	381	DYSGND	382	ESQLLHGLFE	383
30	C33H69	271	GGSISSSSY	384	NYSGS	385	LDGYESPFD	386
	C33H70	272	GGSI RGSSY	387	YSSGN	388	LGSLVVVPAAMSFD	389
	C33H72	273	GFTFSSY	390	KQHGSE	391	DRDLGYFD	392
35	C33H73	274	RFTFSSY	393	NISGGS	394	GGYSSGPFD	395
	C33H74	275	RFTFSSY	396	SYDGSN	397	DFRSFDWLPPDSASYHGMD	398
	C33H76	276	GFTFNY	399	SGSGGS	400	TYNSGYDGD	401
40	C33H78	277	GFTFSSY	402	SYDGSN	403	DFRYFDWLPPDSSSYGMD	404
	C33H80	278	GYTFTNY	405	NTNTGN	406	DRDRGTD	407
	C33H81	279	GFTFSAY	408	SYDGSN	409	DFRSFDWLPPDSASYHGMD	410
45	C33H84	280	GFTFSSY	411	SYDGSN	412	DFRSFDWLPPDSTSYGMD	413
	C33H87	281	GFTFSSY	414	KQHGSE	415	DRDLGYFD	416
	C33H88	282	GYTLTRS	417	NTNTGN	418	DILPGYHED	419
50	C33H90	283	GDSVSSNSA	420	YYRSKWY	421	EVAVAASFD	422
	C33H91	284	GGSISSRSH	423	YYTGS	424	LADIVVPAARYFD	425
	C33H92	285	GGSISSSSY	426	YSSGN	427	LAATIVPAARYFD	428
55	C33H98	286	GFTFSSY	429	KQHGSE	430	DRDLGYFD	431
	C33H99	287	GFTFSSY	432	KRDGGE	433	PFYDHFD	434
	C33H108	288	GYTFSTY	435	NTNTGN	436	DRDRGTD	437
60	C33H249	289	GFTFDDY	438	SWNGGN	439	DTPYGDYFD	440
	C33H250	290	GFTFDDY	441	SWNGGN	442	DSPYGDYFD	443
	C33H251	291	GFTFDDY	444	GWSGGS	445	DSPYGDFFD	446
65	C33H252	292	GFTFDDY	447	GWSGGS	448	DSPYGDFFD	449
	C33H253	293	GFTFRSY	450	NGYGDG	451	DQGFGEFFD	452
	C33H254	294	GFTFSYY	453	WFDGNN	454	DRELLFD	455
	C33H255	295	GFTFDDY	456	SWNGGD	457	DMPYFDLTGSDYYYYGMD	458

ES 2 998 890 T3

HC ID	ID	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
C33H256	296	GFTFSNY	459	WYVGSH	460	DGSLCFD	461

5 Tabla 22: Secuencias de CDR1-3 de cadena ligera

LC ID	ID	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
B23L3	297	SQSVDYNGISY	462	AAS	463	IIEDPW	464
CD3L66	298	STGAVTTSNY	465	GTN	466	WYSNLW	467
CD3L150	299	TSSNIGTYKF	468	EVS	469	YAGSGTL	470
C33L8	300	DKLGDKY	471	QDS	472	WDSSTY	473
C33L10	301	SNIGSKS	474	DDS	475	WDSSSDV	476
C33L11	302	HKLGDYK	477	KDS	478	WDSSTV	479
IAPL24	303	DKLGDKY	480	QDS	481	WDSSTV	482
C33L58	304	DKLGDKY	483	QDY	484	WDSSTY	485
C33L59	305	DKLGDKY	486	QDY	487	WDISTY	488
C33L34	306	DKLGDKY	489	QDS	490	WDSSTW	491
N46L109	307	DKLGDKY	492	QDS	493	WDSSTW	494
C33L42	308	NNIGIKS	495	DDS	496	WDSSSDHV	497
C33L47	309	DKLGDKY	498	QDR	499	WDSSTV	500
C33L60	310	DKLGDKY	501	QDG	502	WDRNTV	503
C33L17	311	SOSVLYSSNNKNY	504	WAS	505	YYGTPW	506
C4LL152	312	SOGISSW	507	AAS	508	ANSFPF	509
C33L40	313	NKLGAKF	510	QDN	511	WDSSTV	512
C33L32	314	DKLGDKY	513	QDS	514	WDSSTGV	515
C33L38	315	DKLGDKY	516	QDN	517	WGRNTV	518
C33L39	316	TSSDDGKNNI	519	KDS	520	YAGASNHV	521
C33L57	317	DELGNKY	522	QDR	523	WDSSTV	524
C33L73	318	TSSDVGDYNY	525	DVS	526	YSSSSALE	527
C33L53	319	DKLGDKY	528	QDN	529	WDSNTV	530
C33L66	320	DKLGDKY	531	QDR	532	WDSSTV	533
C33L35	321	DKLGDKY	534	QDT	535	WDSSTV	536
C33L61	322	INSDVGSYDL	537	DGS	538	YEVTTTTYV	539
C33L51	323	NNIGSKS	540	DDS	541	WDSNSDHV	542
C33L44	324	DKLGDKY	543	QDS	544	WDSSTY	545
C33L30	325	DRLGDYK	546	QDS	547	WDSSSY	548
C33L69	326	DKLGSKF	549	QDS	550	WDSSTV	551
C33L37	327	SNIGKIS	552	DDR	553	WNSSSVHP	554
C33L74	328	TSSDVGDYNY	555	DVS	556	YSSSTTLE	557
C33L115	329	SQGISSW	558	RSS	559	DNSFPY	560
C33L116	330	SQGISSW	561	GAS	562	DNSFPY	563
C33L117	331	SQTVLYSSNNKNY	564	WAS	565	YYSTPY	566
C33L118	332	SQTVFYSSNNKNY	567	WAS	568	YYSTPY	569

ES 2 998 890 T3

LC ID	ID	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
C33L119	333	SQSISSW	570	KAS	571	YNSYPW	572
C33L120	334	DELGDMY	573	QDS	574	WDTRIA	575
C33L121	335	DNLGNEH	576	QNN	577	WDSTTA	578
C33L122	336	VTLGyny	579	QDT	580	WDITTV	581
C33L132	337	DKLGDKY	582	QDG	583	WDRNTV	584
C33L41	338	DKLGnKY	585	QDS	586	WDSSTV	587

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 que comprende un anticuerpo anti-CD33 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde:

el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3, que tiene la secuencia polipeptídica de las id. de sec. n.º 447, 448, 449, 567, 568 y 569, respectivamente; el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2 y LCDR3, que tiene la secuencia polipeptídica de:

- 1) id. de sec. n.º: 342, 343, 344, 465, 466 y 467, respectivamente; o
- 2) id. de sec. n.º: 345, 346, 347, 468, 469 y 470, respectivamente.

2. El anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica al menos 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 292, o una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica al menos 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 332; y el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica al menos 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 257 o 258, o una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica al menos 95 % idéntica a la id. de sec. n.º: 298 o 299.

3. El anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende:

- a. una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 292, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 332; y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 257, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 298; o
- b. una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 292, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 332; y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 258, y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 299.

4. El anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:

- a. el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo es quimérico; o
- b. el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo es humano o humanizado.

5. El anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 183, y una cadena ligera que tiene la secuencia de polipéptidos de id. de sec. n.º: 215; y una cadena pesada que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 245, y una cadena ligera que tiene la secuencia polipeptídica de id. de sec. n.º: 251.

6. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 6.

8. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 7.

9. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5; y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, en donde opcionalmente el cáncer es un cáncer hematológico, por ejemplo, en donde el cáncer hematológico se selecciona del grupo que consiste en una leucemia, un linfoma o un mieloma múltiple; tal como la leucemia mieloide aguda (AML), el síndrome mielodisplásico (MDS), la leucemia

linfocítica aguda (LLA), el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), la leucemia mieloide crónica (LMC) o la neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (DPDCN).

11. Un método para producir el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno en condiciones para producir el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno, y recuperar el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno de la célula o cultivo.

12. Un método para producir una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo el método combinar el anticuerpo biespecífico anti-CD33/anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

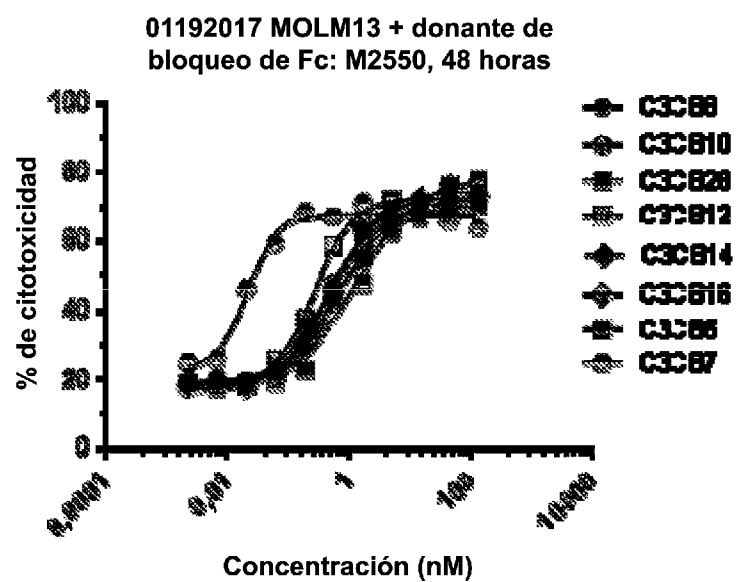


Figura 1A

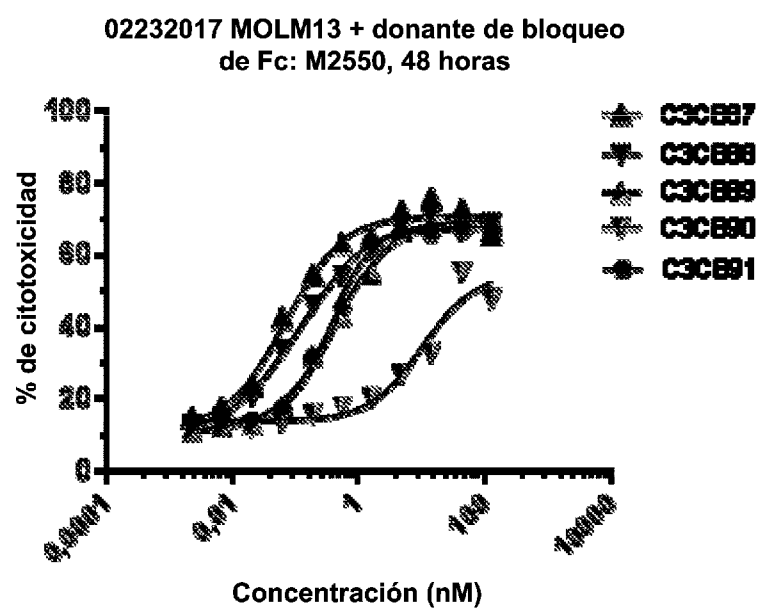


Figura 1B

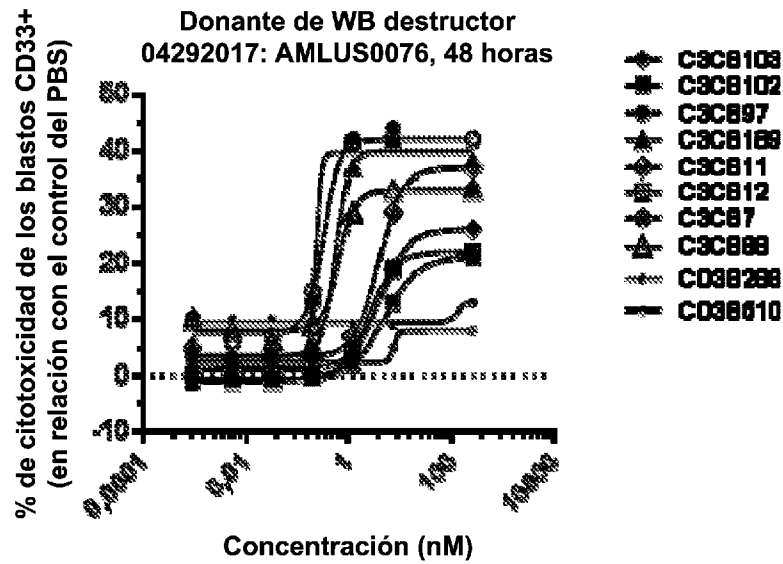


Figura 2A

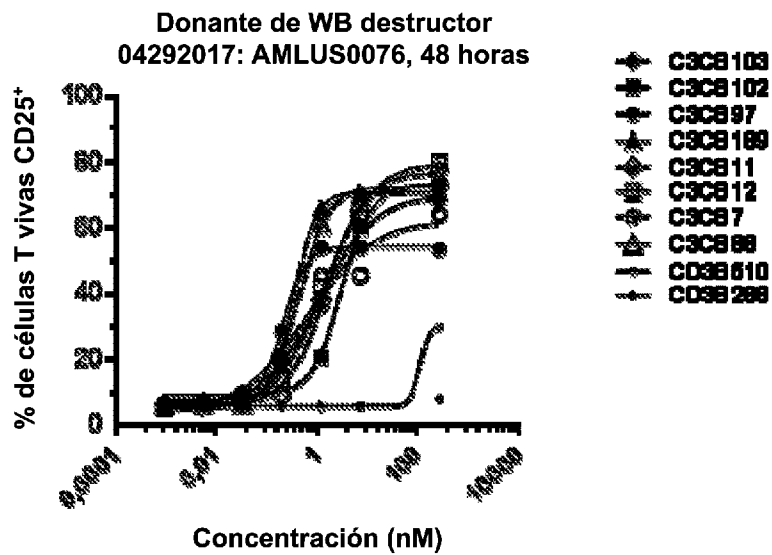


Figura 2B

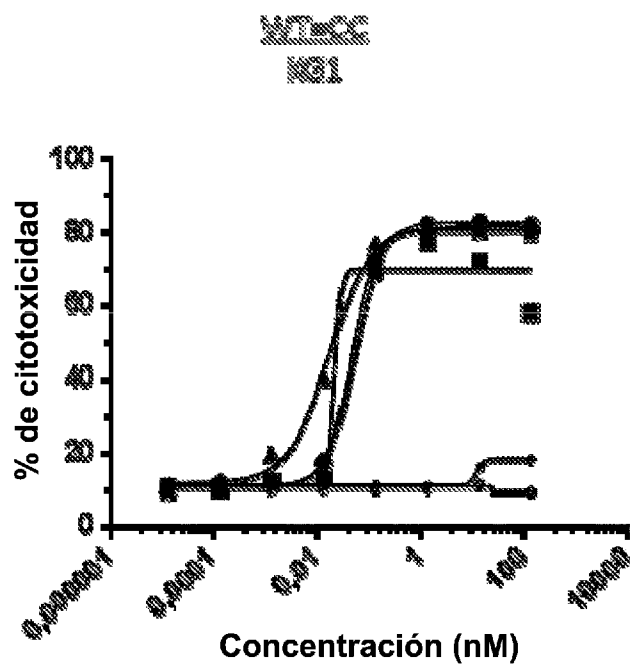


Figura 3A

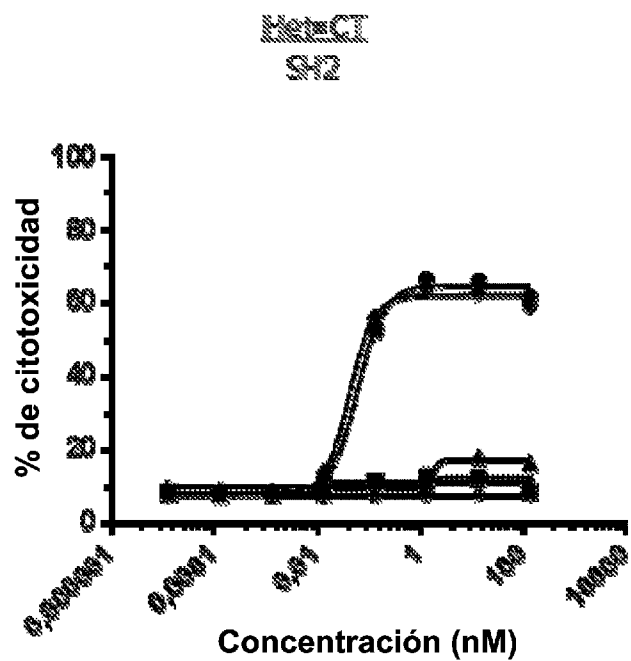


Figura 3B

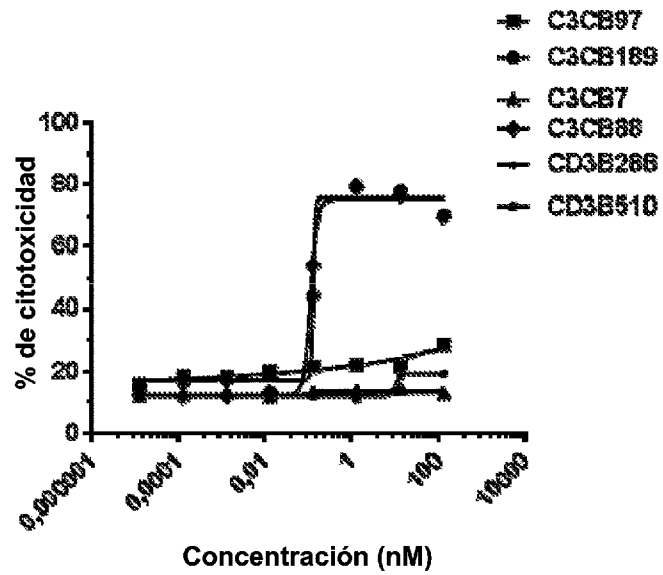


FIG. 3C

08012017 MOLM13 en sangre humana normal
48 horas, ET 1:5

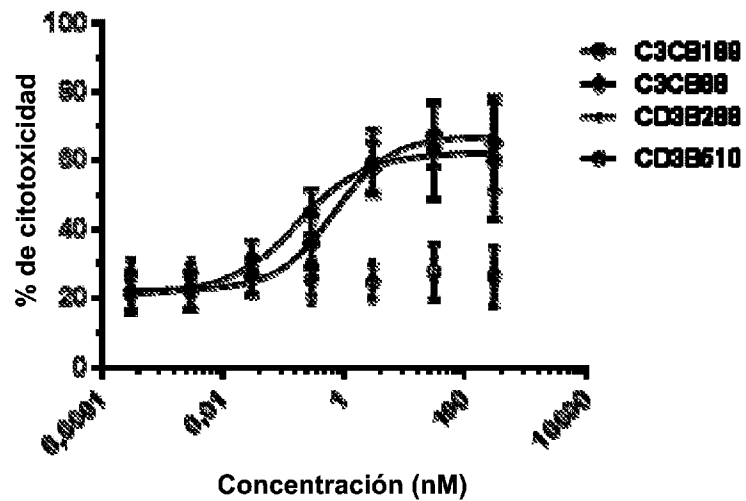


FIG. 4A

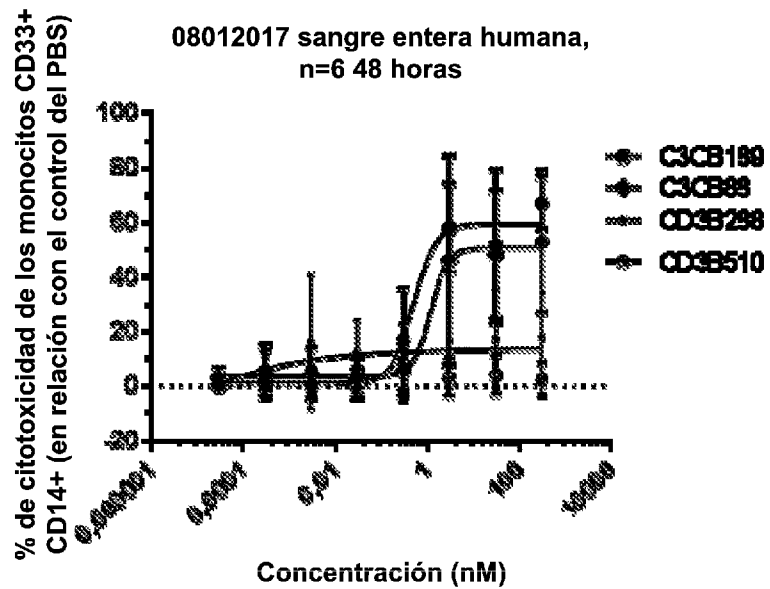


Figura 4B

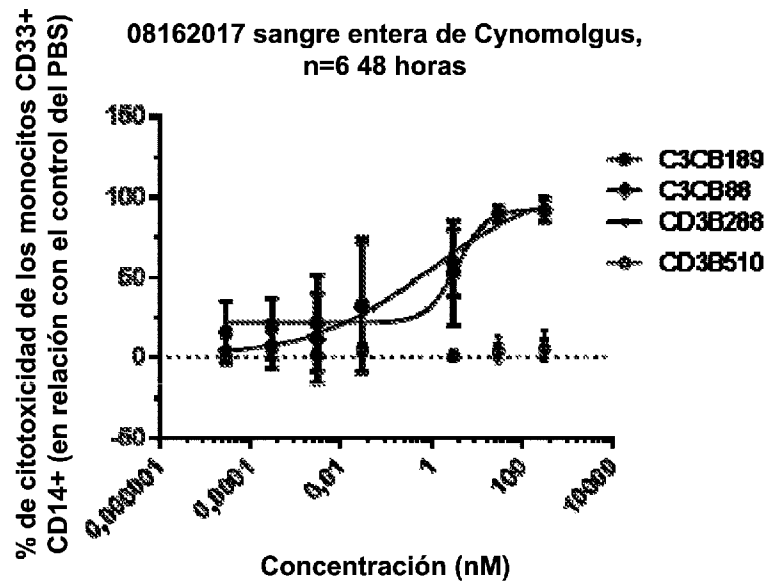


Figura 5A

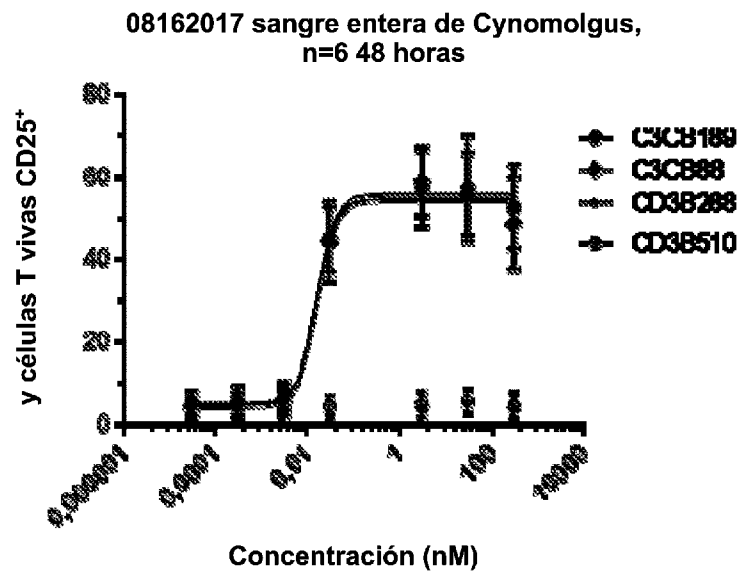


Figura 5B

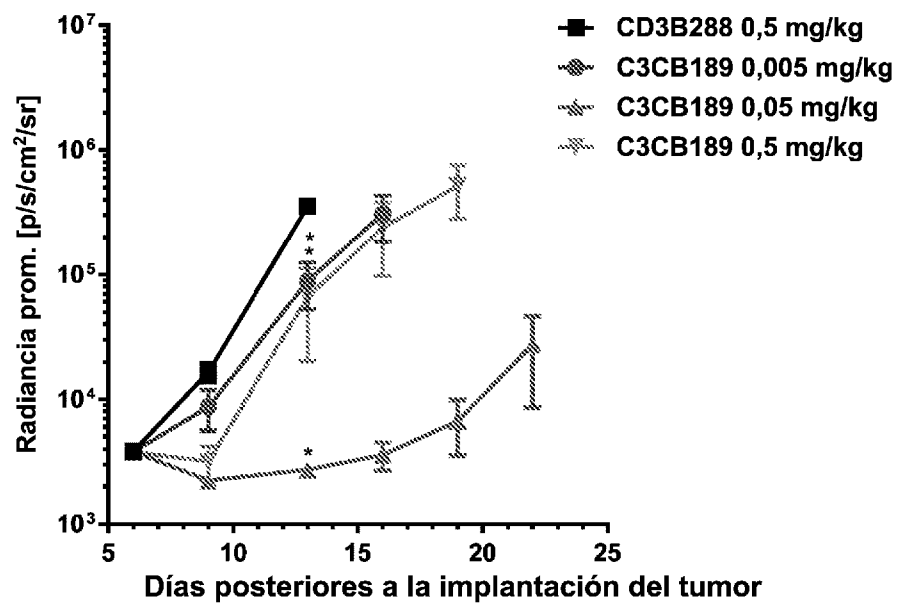


Figura 6

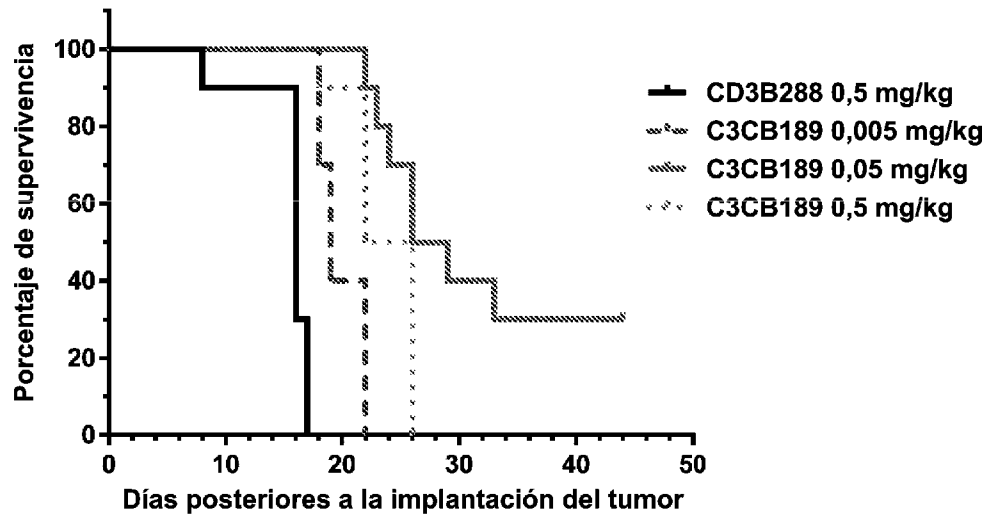


Figura 7

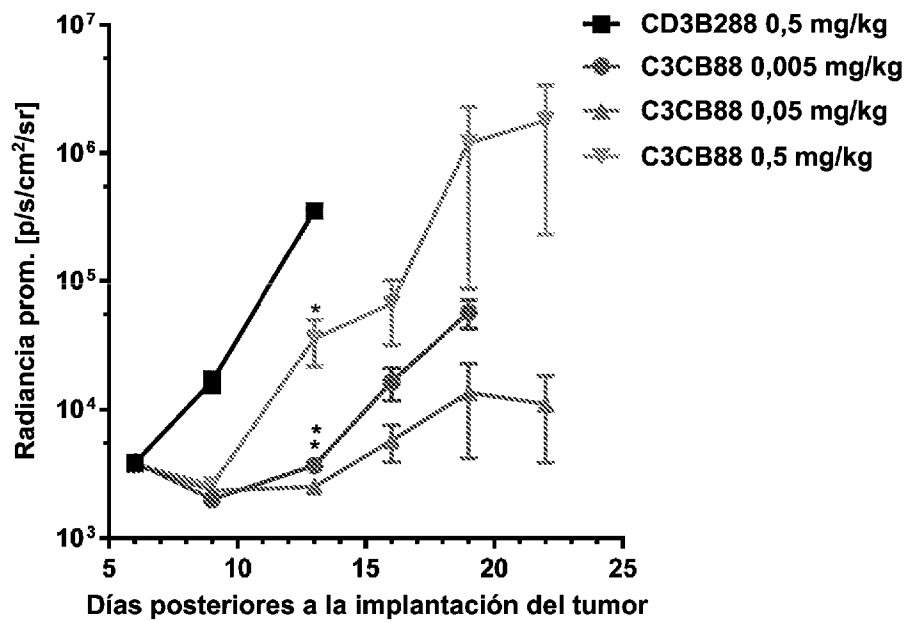


Figura 8

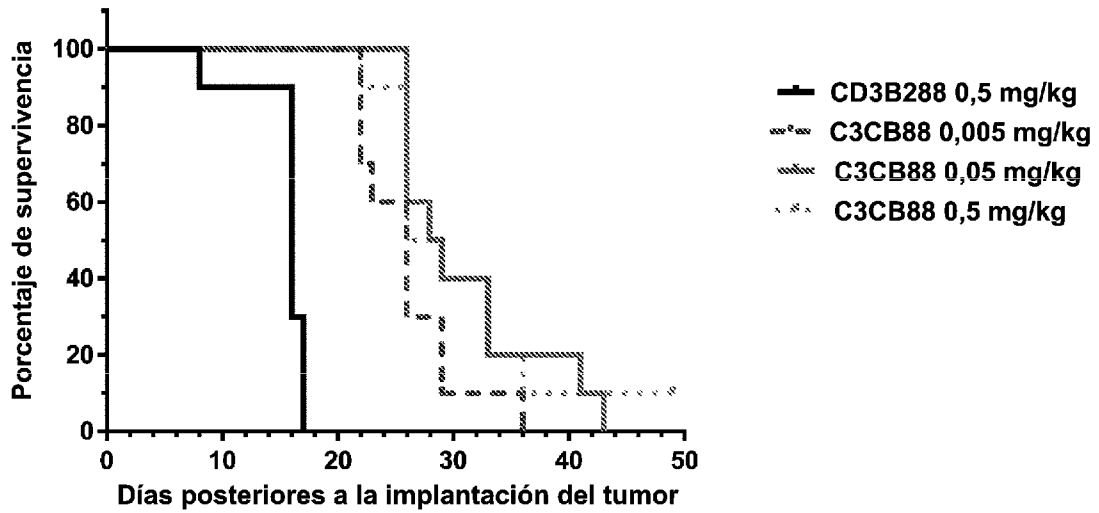


Figura 9

Ensayo de proteína A-MMAF

Células Molm13 (72 horas después del tratamiento)

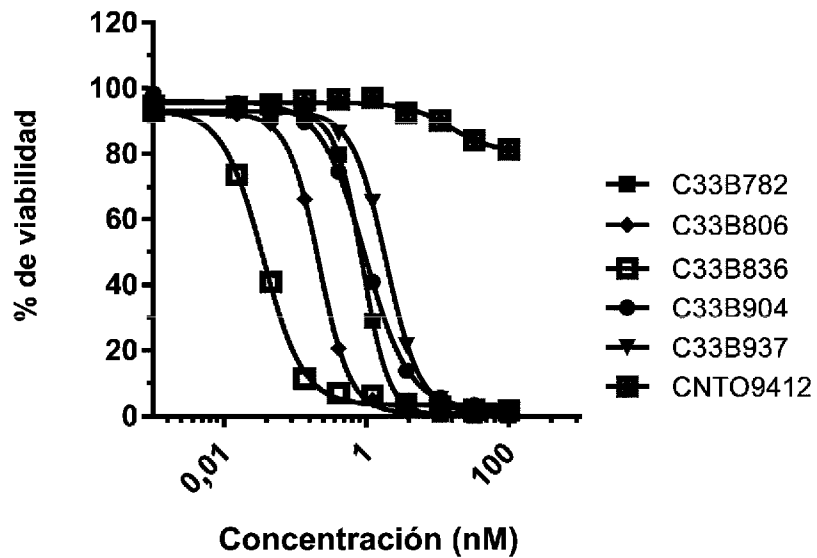


Figura 10

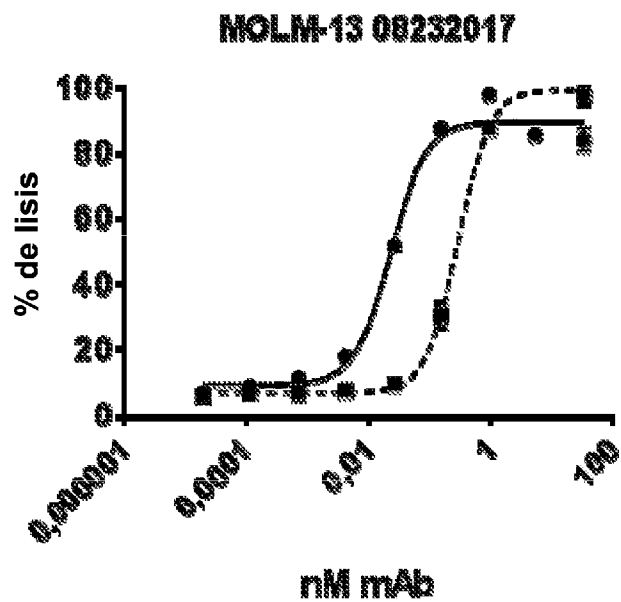


Figura 11A

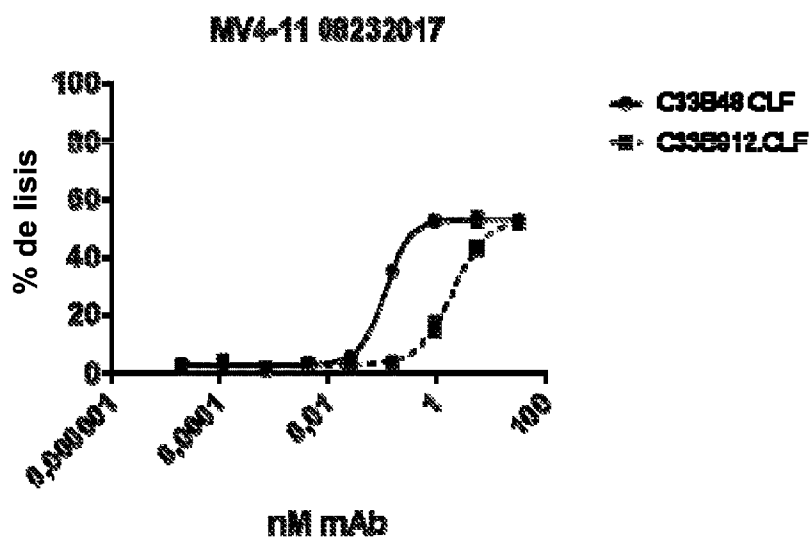


Figura 11B

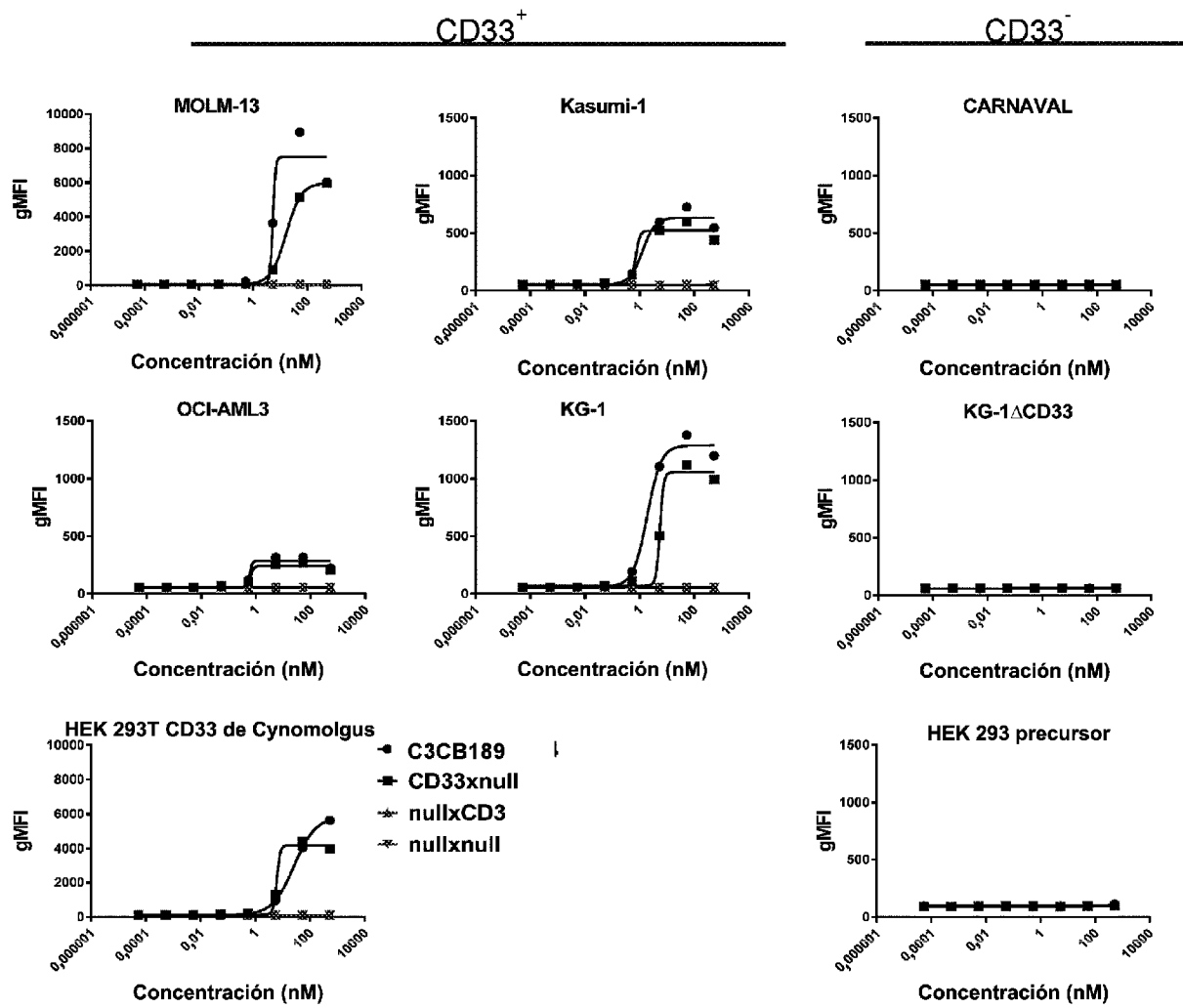


Figura 12

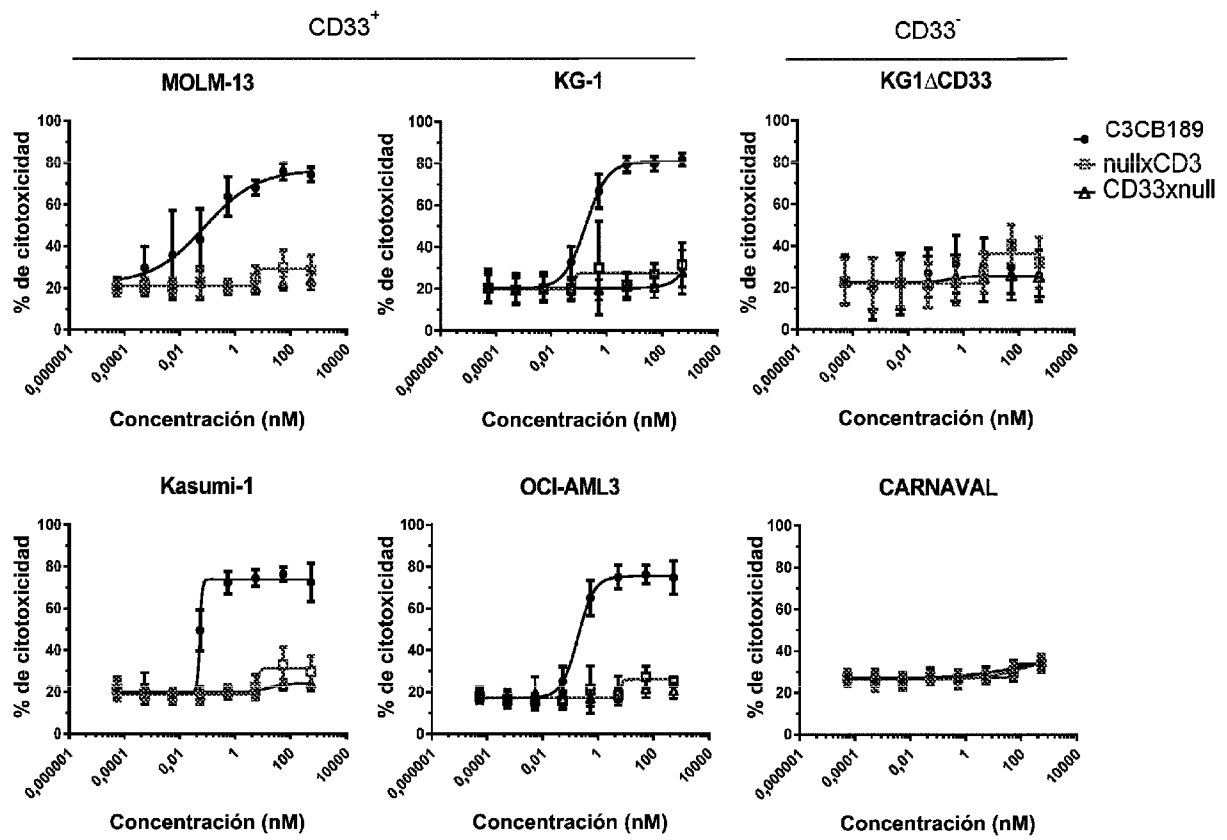


Figura 13

Figura 14A

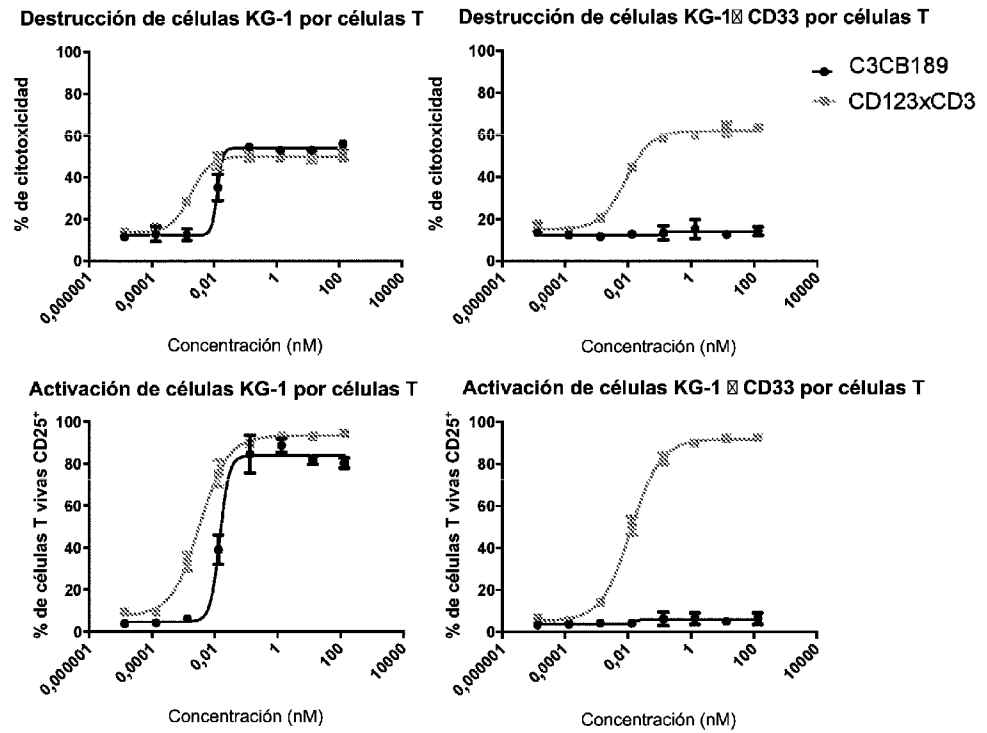


Figura 14B

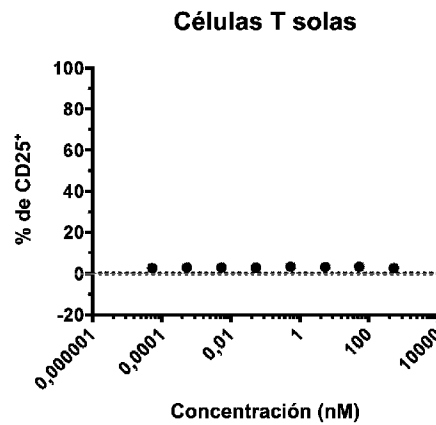


Figura 15A

Concentración eficaz (nM)	MOLM-13	KG-1	Kasumi-1	OCI-AML3
EC ₂₅	0,0283	0,0525	0,0366	0,0844
EC ₅₀	0,1307	0,1677	0,0500	0,1826
EC ₇₅	2,2863	1,8978	0,0842	0,6220

Figura 15B

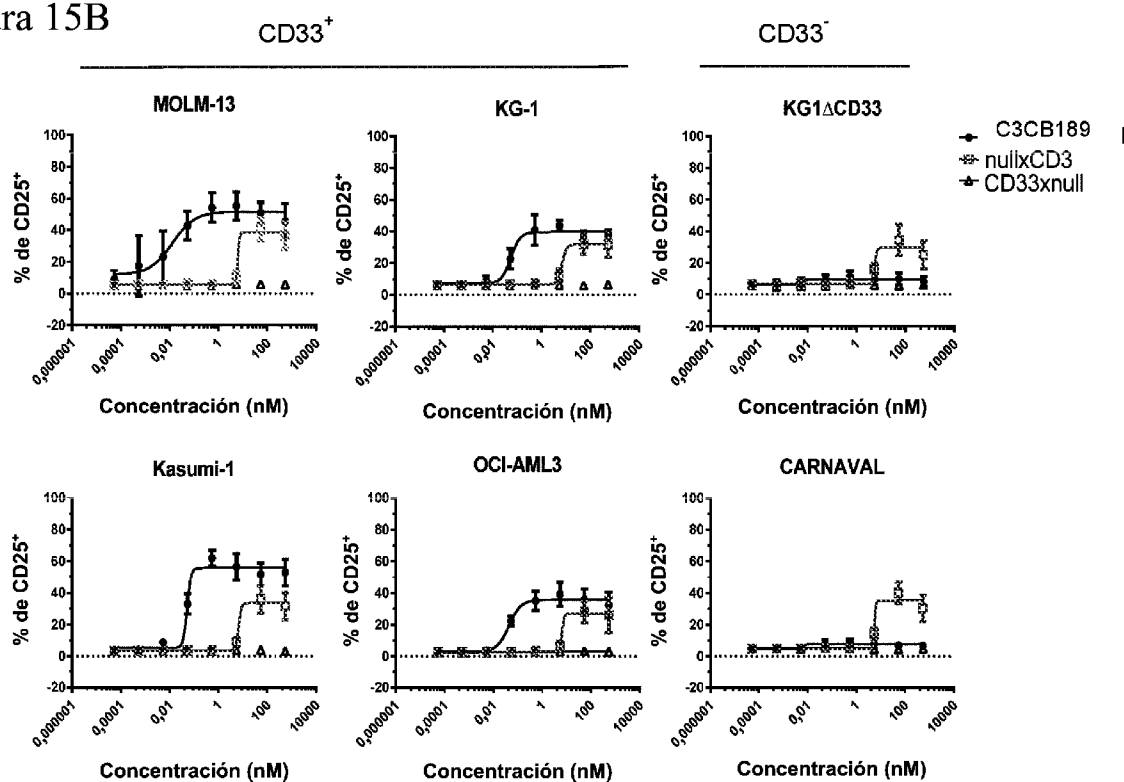


Figura 15C

Concentración eficaz (nM)	MOLM-13	KG-1	Kasumi-1	OCI-AML3
EC ₂₅	0,0077	0,0256	0,0267	0,0178
EC ₅₀	0,0283	0,0684	0,0432	0,0500
EC ₇₅	0,1677	0,4236	0,1126	0,2585

Figura 16A KG-1

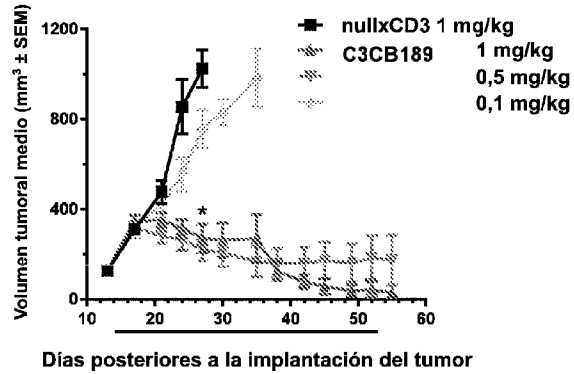


Figura 16B MOLM-13

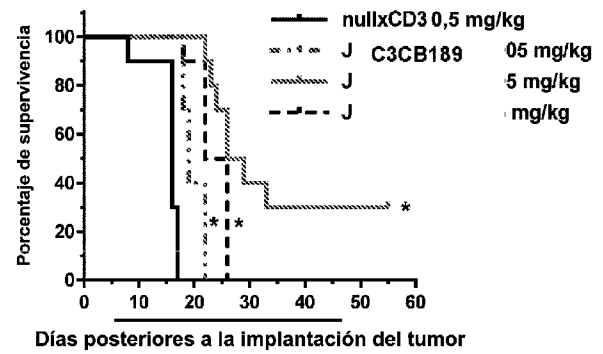


Figura 16C

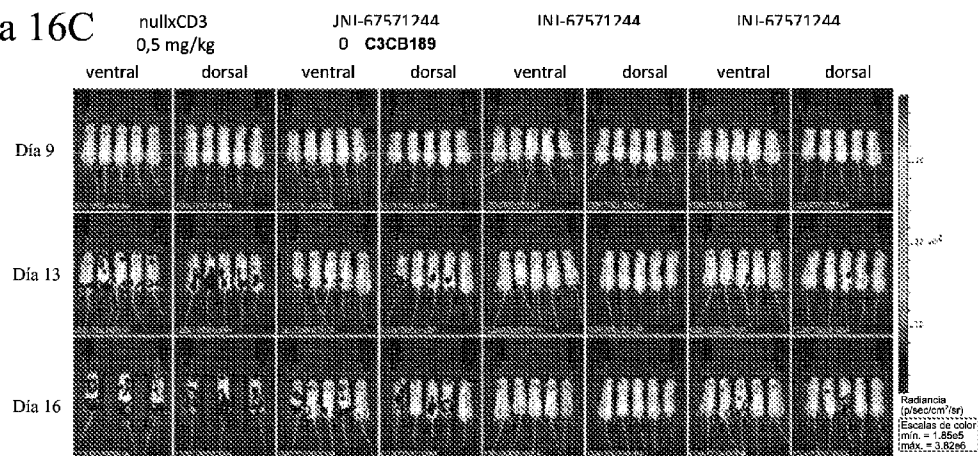


Figura 16D

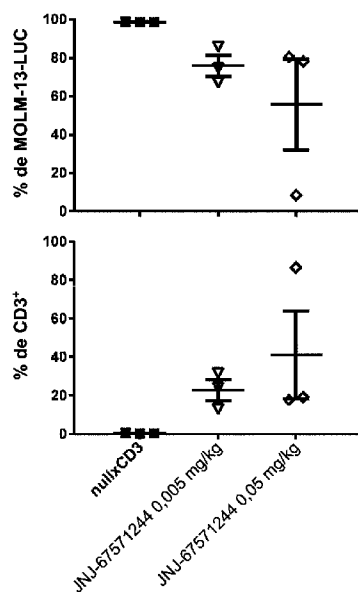
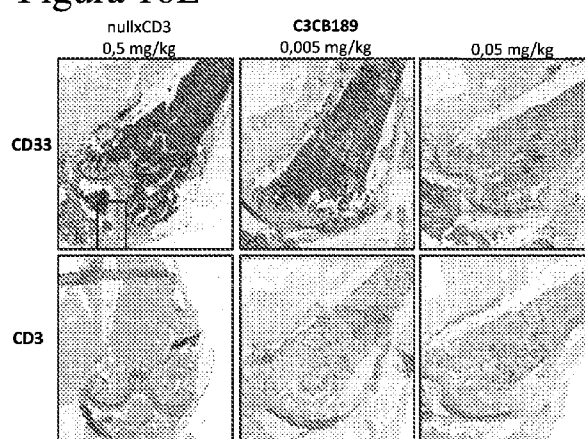


Figura 16E



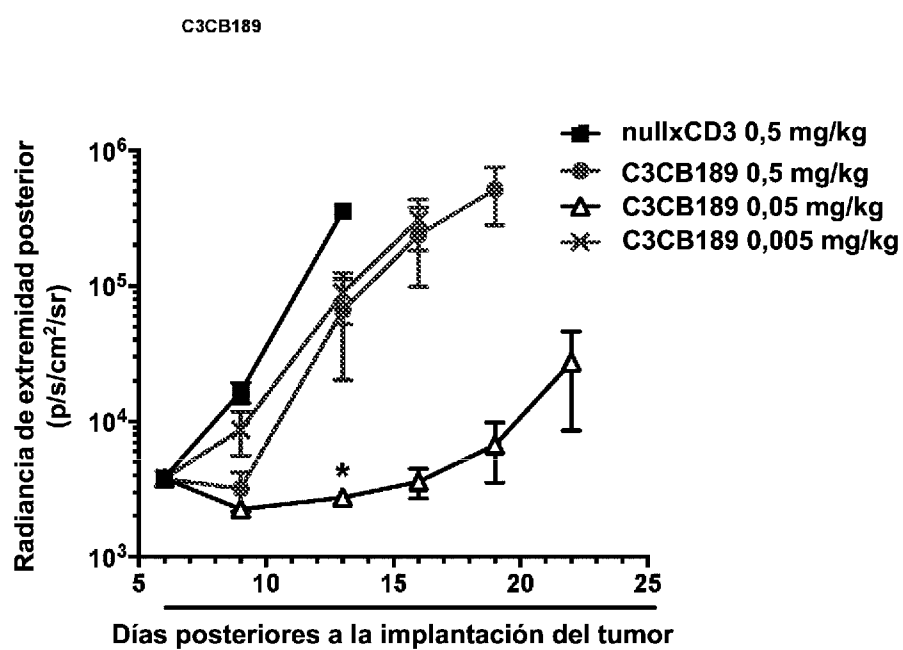


Figura 17

Figura 18A

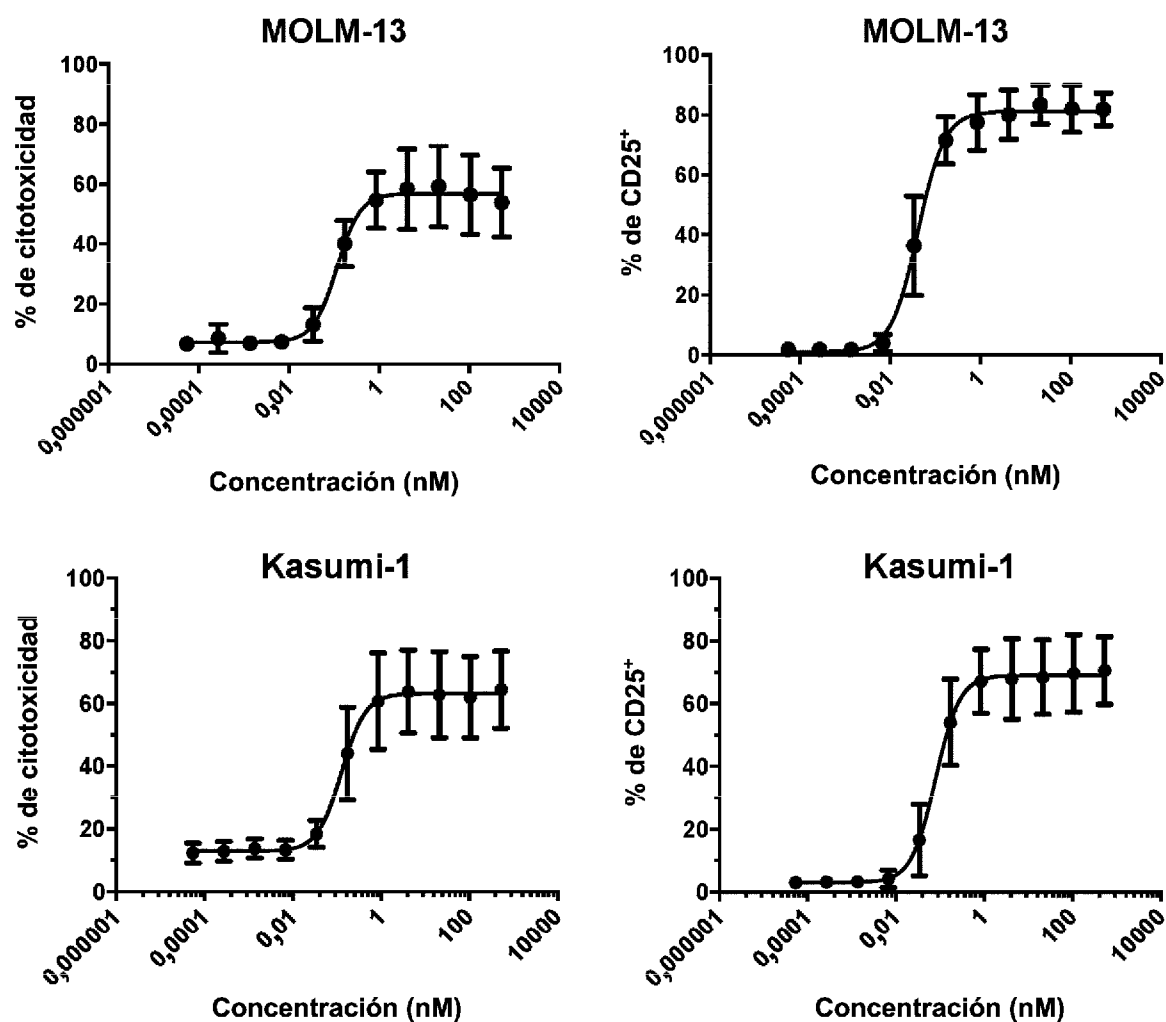


Figura 18B

Concentración eficaz (nM)	Mediana de citotoxicidad: MOLM-13	Mediana de activación de las células T: MOLM-13	Mediana de citotoxicidad: Kasumi-1	Mediana de activación de las células T: Kasumi-1
EC ₂₀	0,017	0,054	0,039	0,060
EC ₅₀	0,037	0,111	0,085	0,124
EC ₉₀	0,132	0,420	0,281	0,496

Figura 19A

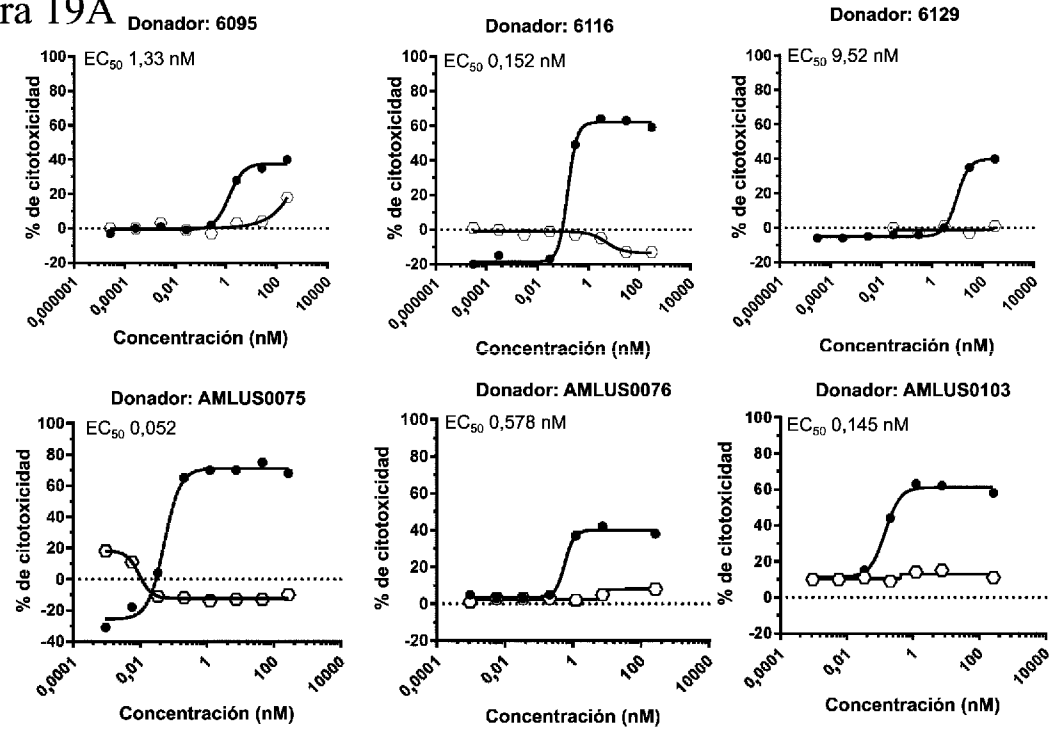
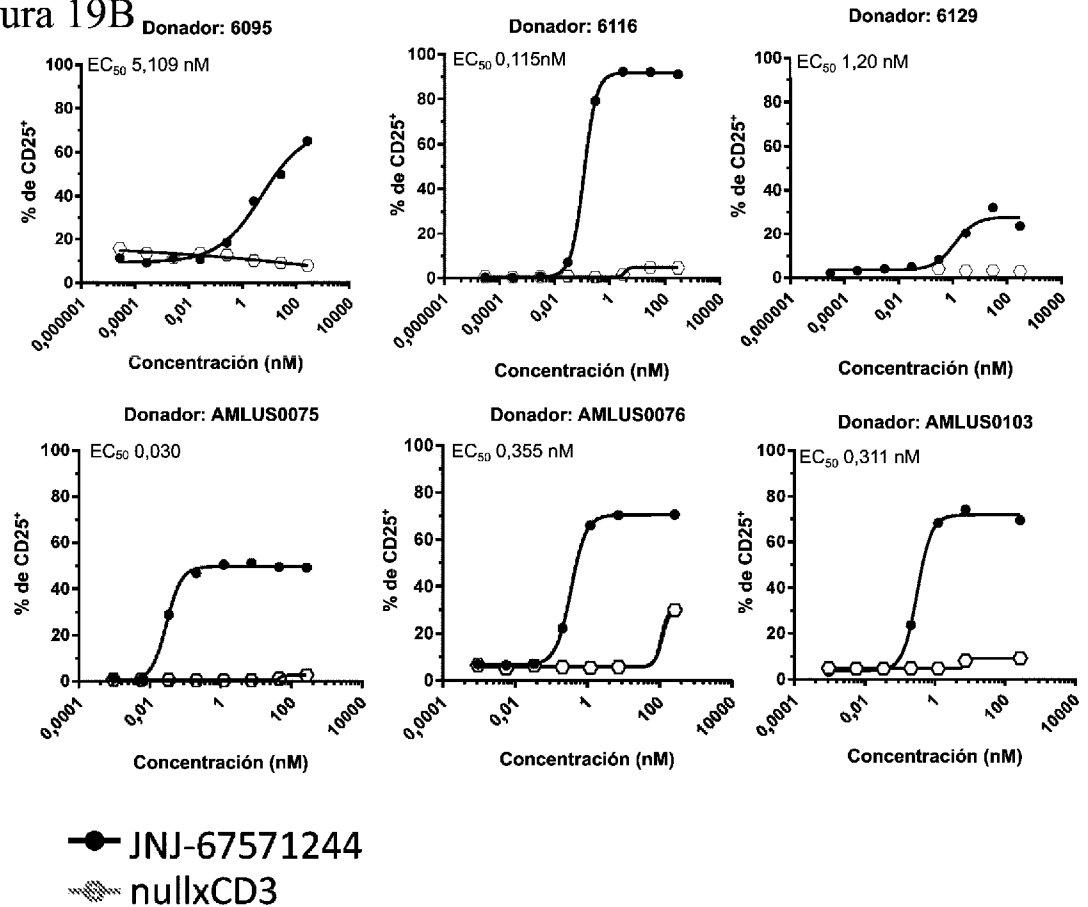


Figura 19B



C3CB189

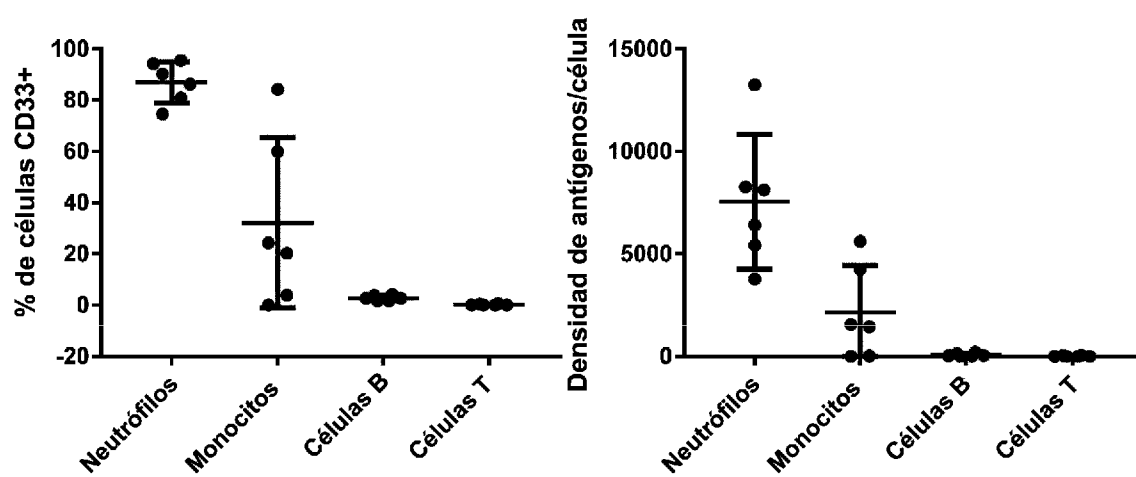


Figura 20

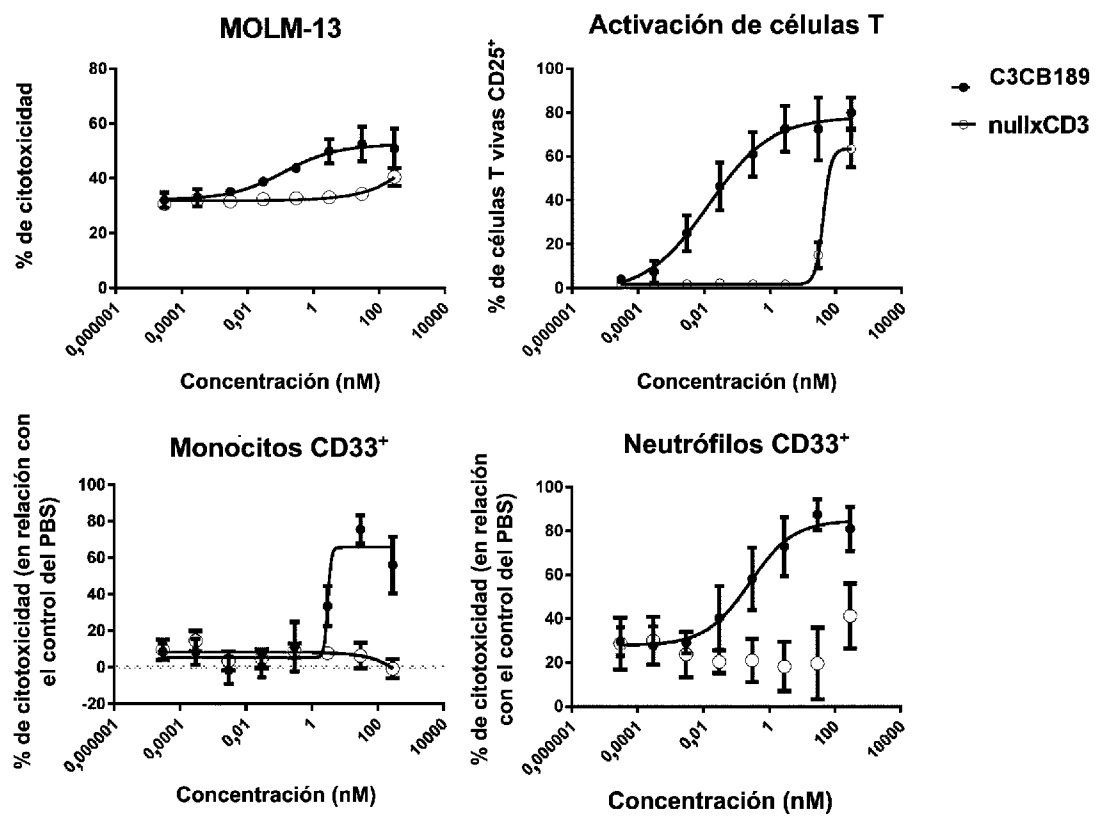


Figura 21

Figura 22A

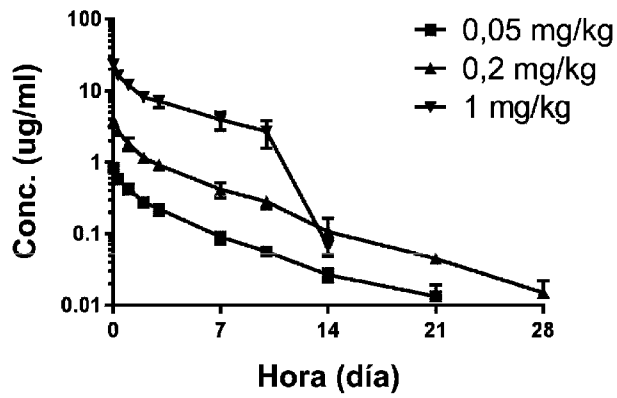


Figura 22B

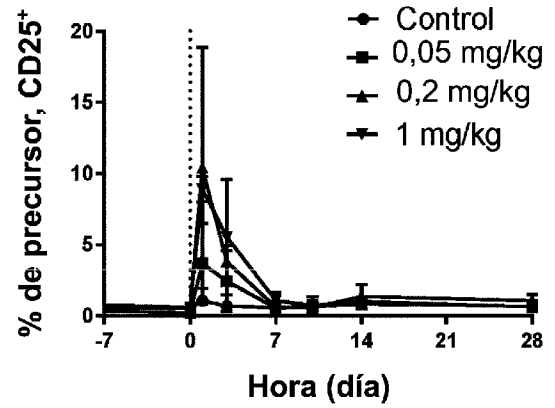


Figura 22C

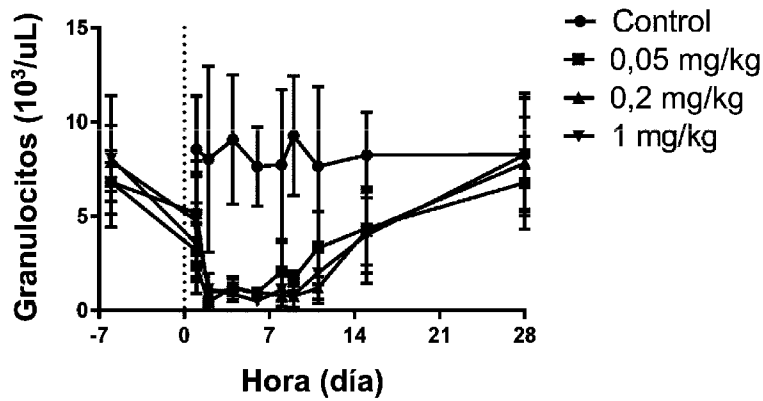
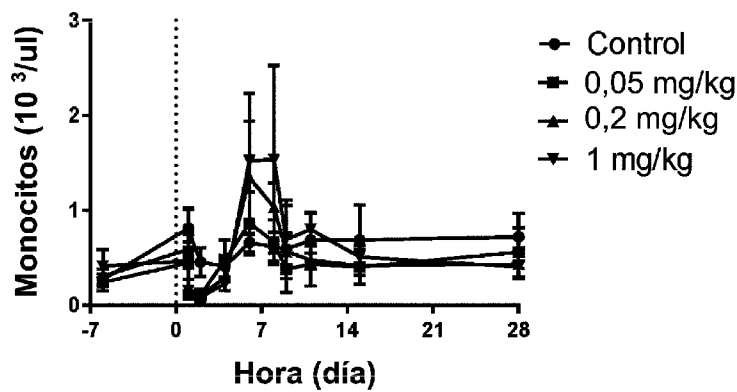


Figura 22D



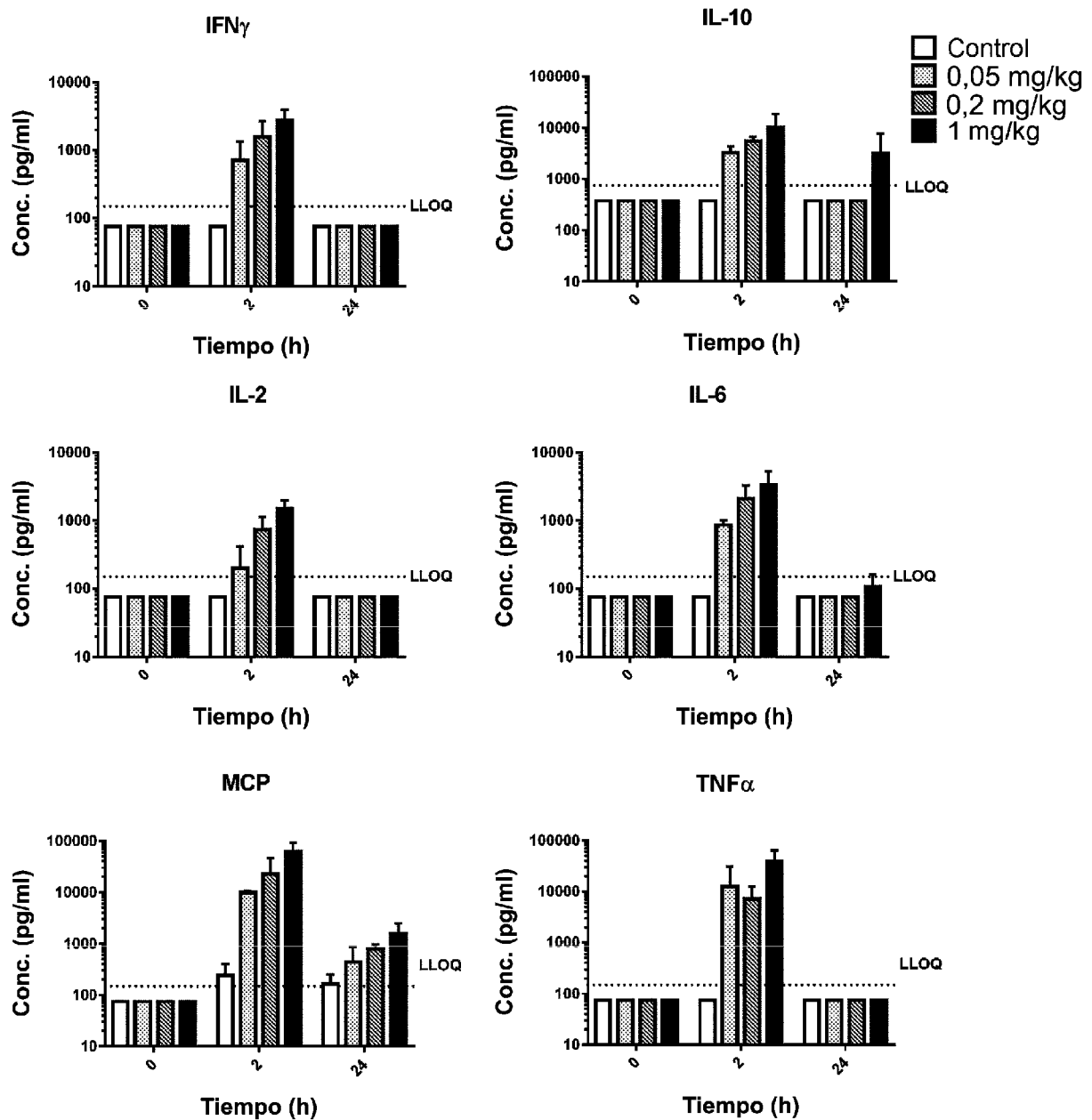


Figura 23

Figura 24A



Figura 24B

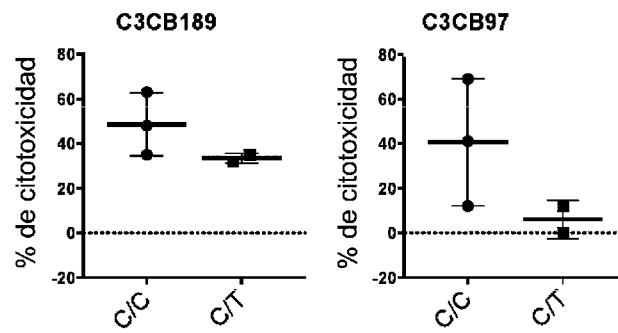


Figura 24C

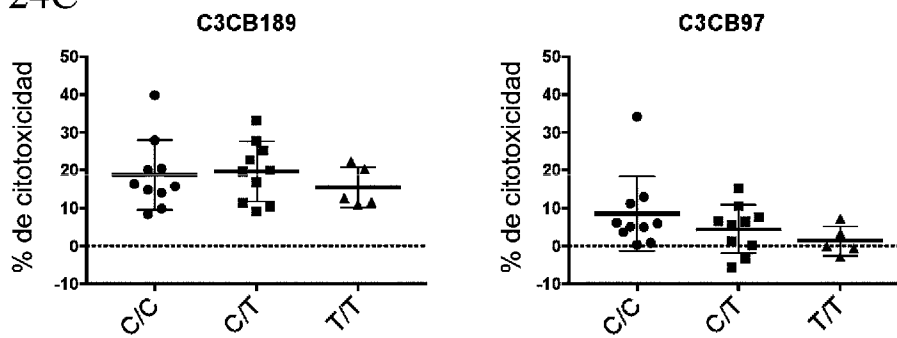


Figura 25A

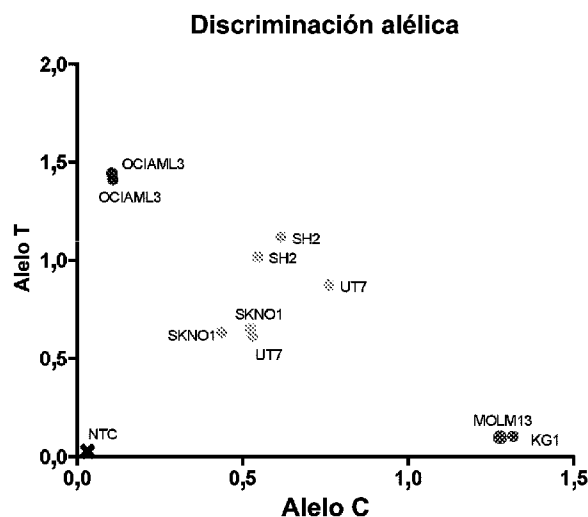
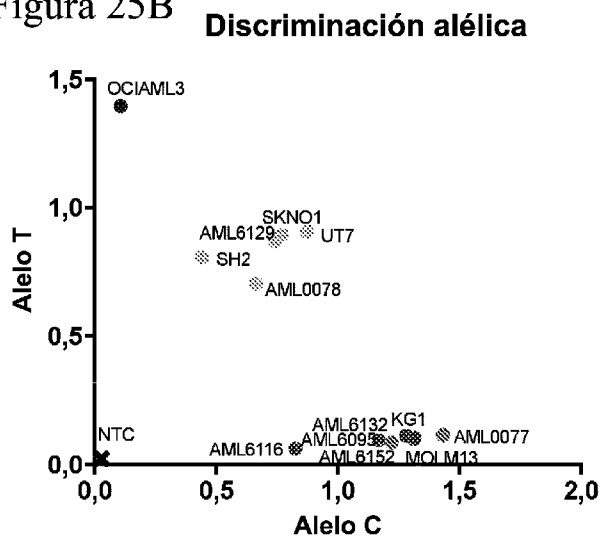


Figura 25C

ID de muestra	Rs12459419 (tagman)	Rs12459419 (sanger)
D1	C/C	C C
D2	C/T	C T
D3	T/T	T T
D4	C/C	C C
D5	C/C	C C
D6	C/C	C C
D7	C/T	C T
D8	T/T	T T
D9	C/C	C C
D11	C/T	C T
D12	C/T	C T
D13	C/T	C T
D14	C/T	C T
D17	C/T	C T
D18	C/C	C C
D20	T/T	T T
D21	C/T	C T
D22	T/T	T T
D23	C/C	C C
D24	C/T	C T
D25	C/C	C C
D26	C/C	C C
D28	T/T	T T
D29	C/T	C T
D30	C/C	C C
Totales:	C C; 10	C C; 10
	C T; 10	C T; 10
	T T; 5	T T; 5

Figura 25B



Leyenda

● Alelo 1/Alelo 1 homocigoto	● Alelo 2/Alelo 2 homocigoto
● Alelo 1/Alelo 2 heterocigoto	● Indeterminado