

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 972**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2019 PCT/US2019/038163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.12.2019 WO19246356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2019 E 19739472 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3810281**

54 Título: **Métodos para tratar el cáncer con anticuerpos biespecíficos anti-CD3xMUC16 y anticuerpos anti-PD-1**

30 Prioridad:

21.06.2018 US 201862688251 P

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

31.10.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

CRAWFORD, ALISON

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 984 972 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

Métodos para tratar el cáncer con anticuerpos biespecíficos anti-CD3xMUC16 y anticuerpos anti-PD-1

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para tratar el cáncer que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une de manera específica al receptor de muerte programada 1 (PD-1) junto con un anticuerpo biespecífico que se une a mucina 16 (MUC16) y a CD3.

10

Antecedentes

La mucina 16 (MUC16), también conocida como antígeno de cáncer 125, antígeno de carcinoma 125, antígeno carbohidrato 125 o CA-125, es una glucoproteína de membrana integral muy glucosilada de un solo dominio transmembrana que se expresa en gran medida en el cáncer de ovario. MUC16 consiste en tres dominios principales: un dominio N-terminal extracelular, un gran dominio repetido en tándem intercalado con dominios de esperma de erizo de mar, enterocinasa y agrina (SEA), y un dominio carboxiterminal que comprende un segmento de la región transmembrana y una cola citoplasmática corta. La escisión proteolítica produce el desprendimiento de la parte extracelular de MUC16 en el torrente sanguíneo. La MUC16 se sobreexpresa en cánceres, incluido el cáncer de ovario, 20 cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón no microcítico, colangiocarcinoma intrahepático de tipo formador de masa, adenocarcinoma del cuello uterino y adenocarcinoma del tubo gástrico, y en enfermedades y afecciones que incluyen la enfermedad inflamatoria intestinal, cirrosis hepática, insuficiencia cardíaca, infección peritoneal y cirugía abdominal. (Haridas, D. *et al.*, 2014, FASEB J., 28:4183-4199). Se ha demostrado que la expresión en células cancerosas protege a las células tumorales del sistema inmunitario. (Felder, M. *et al.*, 2014, Molecular Cancer, 13:129) "Methods for treating ovarian cancer using antibodies to MUC16 have been investigated". Oregovomab y abgovomab son anticuerpos anti-MUC16 que han tenido un éxito limitado. (Felder, anteriormente citado, Das, S. y Batra, S. K. 2015, Cancer Res. 75:4660-4674.)

15

20

25

30

35

CD3 es un antígeno homodimérico o heterodimérico expresado en linfocitos T junto con el complejo receptor de linfocitos T (TCR) y es necesario para la activación de los linfocitos T. El CD3 funcional se forma a partir de la asociación dimérica de dos de cuatro cadenas diferentes: ϵ , ζ , δ y γ . Las disposiciones diméricas de CD3 incluyen γ/ϵ , δ/ϵ y ζ/ζ . Los anticuerpos contra CD3 han mostrado agrupar CD3 sobre los linfocitos T, produciendo por tanto la activación de los linfocitos T de una manera similar a la participación de los TCR por las moléculas MHC cargadas de péptidos. Por tanto, se han propuesto anticuerpos anti-CD3 con fines terapéuticos que implican la activación de linfocitos T. Además, se han propuesto anticuerpos biespecíficos con capacidad de unión a CD3 y un antígeno diana para usos terapéuticos que implican el direccionamiento de las respuestas inmunitarias de los linfocitos T a tejidos y células que expresan el antígeno diana.

40

45

La señalización del receptor de muerte programada-1 (PD-1) en el microambiente tumoral desempeña un papel clave al permitir que las células tumorales escapen a la vigilancia inmunitaria del sistema inmunitario del hospedador. El bloqueo de la vía de señalización de PD-1 ha demostrado actividad clínica en pacientes con múltiples tipos de tumores, y los medicamentos con anticuerpos que bloquean PD-1 (*por ejemplo*, nivolumab y pembrolizumab) se han aprobado para el tratamiento del melanoma metastásico y del cáncer de pulmón no microcítico epidermoide metastásico. Datos recientes han demostrado la actividad clínica del bloqueo de PD-1 en pacientes con LNH invasor y linfoma de Hodgkin (Lesokhin, *et al.* 2014, Resumen 291, 56.º ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, Calif.; Ansell *et al.* 2015, N. Engl. J. Med. 372(4):311-9).

50

55

60

El cáncer de ovario es el más letal de las neoplasias malignas ginecológicas; aunque el número estimado de nuevos casos de cáncer de ovario entre las mujeres estadounidenses es mucho menor que el de otros tipos de cáncer, la relación muerte e incidencia de cáncer de ovario es considerablemente mayor (Siegal *et al.*, CA Cancer J Clin 66:7-30, 2016). Con frecuencia, el cáncer de ovario se diagnostica en una etapa avanzada, lo que contribuye a su letalidad. El tratamiento convencional actual para el cáncer de ovario es la cirugía seguida de quimioterapia, en concreto, una combinación de agentes de platino y taxanos. Aunque la mayoría de los pacientes responden al tratamiento inicial, la mayoría experimenta una recaída de la enfermedad, lo que da lugar a un ciclo de cirugías repetidas y rondas adicionales de quimioterapia. Aunque los cánceres de ovario recurrentes pueden responder a un tratamiento adicional, prácticamente todos ellos acabarán por volverse resistentes a los tratamientos disponibles actualmente. A pesar de los recientes avances en el tratamiento, tales como los inhibidores de PARP para pacientes portadores de BRCA u otras mutaciones de deficiencia en la recombinación homóloga (HRD, del inglés *homologous recombination deficiency*), el cáncer de ovario avanzado sigue siendo una enfermedad con grandes necesidades insatisfechas.

65

La evidencia sugiere que el cáncer de ovario puede ser susceptible de algunas formas de inmunoterapia (Kandalajt *et al.*, J. Clin. Oncol., 29:925-933, 2011). Por ejemplo, pacientes con cáncer de ovario cuyos tumores fueron positivos en la infiltración intraepitelial de linfocitos T CD8⁺ tuvieron una supervivencia general y libre de progresión significativamente mejor que los pacientes sin infiltración intraepitelial de linfocitos T CD8⁺ (Hamanishi *et al.*, PNAS, 104:3360-65, 2007; y Zhang *et al.*, N. Engl. J. Med., 348:203-213, 2003). Asimismo, algunos pacientes han mostrado una respuesta inmunitaria espontánea a sus tumores, demostrado por la detección de linfocitos T reactivos a tumores

y anticuerpos en la sangre, el tumor o la ascitis de pacientes con enfermedad avanzada (Schliengar *et al.*, Clin Cancer Res, 9:1517-1527, 2003). El bloqueo de la vía del punto de control PD-1/PD-L1 ha mostrado cierto beneficio en el cáncer de ovario; la monoterapia con bloqueo de PD-1 dio lugar a una tasa global de remisión (TGR) de aproximadamente un 10 a un 15 % en los primeros ensayos clínicos (Hamanishi *et al.*, anteriormente citado). Sin embargo, el bloqueo de esta vía por sí solo claramente no es suficiente.

En vista de la gran necesidad insatisfecha de tratamientos eficaces para el cáncer de ovario, puede ser útil, como se muestra en el presente documento, combinar el tratamiento con un agente para aumentar la función de los linfocitos T (*por ejemplo*, un inhibidor de PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-1) junto con un agente contra un antígeno diana (un anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3).

El documento WO 2017/053856 divulga anticuerpos que se unen a CD3 con afinidad de unión débil o no detectable y métodos de uso de los mismos. El documento WO 2017/197259 divulga métodos para tratar, reducir la intensidad o inhibir el crecimiento del cáncer (por ejemplo, tumores sólidos). Los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de muerte programada 1 (PD-1) (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1), opcionalmente, junto con radioterapia. Crawford *et al.*, (2019) Science Translational Medicine, 11, 7534 divulga un anticuerpo biespecífico que se une a CD3 y MUC16. El anticuerpo indujo la activación de los linfocitos T y la destrucción de las células de cáncer de ovario *in vitro* y en modelos de ratón.

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

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a muerte programada 1 (PD-1) para su uso en un método para tratar o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa MUC16 junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a MUC16 y un segundo brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a CD3, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a PD-1 y el anticuerpo biespecífico, en donde:

(a) el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, HCDR1, HCDR2, HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 y 40, respectivamente;

(b) el primer brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, A-HCDR1, A-HCDR2 y A-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3, en donde A-HCDR1, A-HCDR2, A-HCDR3, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente; y

(c) el segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, B-HCDR1, B-HCDR2 y B-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3, en donde B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 y 13, respectivamente, o de las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 y 13, respectivamente.

La presente invención también proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a MUC16 y un segundo brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a CD3 para su uso en un método para tratar o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa MUC16 junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a muerte programada 1 (PD-1), comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita el anticuerpo biespecífico y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a PD-1, en donde:

(a) el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, HCDR1, HCDR2, HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 y 40, respectivamente;

(b) el primer brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, A-HCDR1, A-HCDR2 y A-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3, en donde A-HCDR1, A-HCDR2, A-HCDR3, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12

y 13, respectivamente; y

(c) el segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, B-HCDR1, B-HCDR2 y B-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3, en donde B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 y 13, respectivamente, o de las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 y 13, respectivamente

En determinadas realizaciones de la presente invención, una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a PD-1 junto con una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico que se une de manera específica a MUC16 y CD3 pueden administrarse de manera secuencial a un sujeto que lo necesita.

En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunos casos, cada dosis del anticuerpo anti-PD-1 comprende entre 10 y 8000 microgramos. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico se administra a una dosis de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunos casos, cada dosis del anticuerpo biespecífico comprende entre 10 y 8000 microgramos. En algunos casos, cada dosis del anticuerpo anti-PD-1 se administra de 0,5 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En algunos casos, cada dosis del anticuerpo biespecífico se administra de 0,5 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En diversas realizaciones, los anticuerpos se administran por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

En algunas realizaciones, el tumor comprende un cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el sujeto es resistente o responde de manera inadecuada a un tratamiento previo, o recae tras él.

En algunos casos, el método comprende además administrar al sujeto un tercer agente terapéutico o tratamiento. En algunas realizaciones, el tercer agente terapéutico o tratamiento se selecciona del grupo que consiste en radiación, cirugía, un agente quimioterápico, una vacuna contra el cáncer, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un inhibidor de la angiopoyetina-2 (Ang2), un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un anticuerpo contra un antígeno específico de tumores, vacuna contra el bacilo de Calmette-Guerin, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, una citotoxina, un inhibidor del receptor de interleucina 6 (IL-6R), un inhibidor del receptor de interleucina 4 (IL-4R), un inhibidor de la IL-10, IL-2, IL-7, IL-21, IL-15, un conjugado de anticuerpo y fármaco, un medicamento antiinflamatorio y un suplemento dietético.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

En algunas realizaciones, la A- HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la A- LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la B-HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y la B-LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la B-HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la B-LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo biespecífico, o ambos, comprenden una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4 humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En otras realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico, respectivamente, incluyen lo siguiente: (a) HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (b) A-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; A-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

A-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; A-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; A-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y A-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (c) B-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; B-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; B-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; B-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; B-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y B-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico, respectivamente, incluyen lo siguiente: (a) la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) la A-HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la A-LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (c) la B-HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y la B-LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; el primer brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; y el segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico, respectivamente, incluyen lo siguiente: (a) HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (b) A-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; A-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; A-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; A-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; A-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y A-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y (c) B-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; B-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; B-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; B-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; B-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y B-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico, respectivamente, incluyen lo siguiente: (a) la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) la A-HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y la A-LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (c) la B-HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la B-LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; el primer brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; y el segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

En diversas realizaciones, la actividad antitumoral del anticuerpo biespecífico no se ve impedida significativamente por la circulación de CA-125 a una concentración de hasta 10 kU/ml. En diversas realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado cáncer de ovario y el sujeto tiene niveles circulantes de CA-125 de hasta 10 kU/ml. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un nivel de CA-125 en suero elevado antes de comenzar el tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un nivel de CA-125 en suero mayor o igual a 2 veces el límite superior de los niveles normales de CA-125 en suero antes de comenzar el tratamiento. Algunas realizaciones incluyen controlar los niveles de CA-125 en suero, por ejemplo, para medir la eficacia del tratamiento mediante la comparación de los niveles de CA-125 en suero en varios puntos durante o después del tratamiento con un nivel inicial de CA-125 en suero en un paciente específico o un nivel inicial de CA-125 en suero en una población total de pacientes.

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Otras realizaciones descritas en la descripción son meramente para fines ilustrativos.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se ilustra la unión de diversas concentraciones del clon 3A5 anti-MUC16 y BSMUC16/CD3-001 a

CA125, según lo determinado por ELISA (descrito en el ejemplo 2 del presente documento). BSMUC16/CD3-001 y su anticuerpo parental MUC16 mostraron una señal de unión marcadamente reducida en todas las concentraciones analizadas en comparación con un clon 3A5 anti-MUC16 que se une a la región repetida de MUC16.

- 5 En la figura 2 se ilustran las curvas medias de crecimiento tumoral para grupos de ratones (5 por grupo) tratados con control de unión a CD3 + control de isotipo (Δ), BSMUC16/CD3-005 + control de isotipo (\square), control de unión a CD3 + anti-PD-1 (\blacktriangle) y BSMUC16/CD3-005 + anti-PD-1 (\blacksquare) (como se describe en el ejemplo 3 en el presente documento). La combinación de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo biespecífico anti-CD3xMUC16 inhibió de manera sinérgica el crecimiento tumoral.
- 10 En la figura 3 se ilustra el impacto de la incubación de linfocitos T con BSMUC16/CD3-001 en el porcentaje de linfocitos T positivos para PD-1.

Descripción detallada

- 15 Antes de describir la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización o característica de las realizaciones se puede combinar entre sí, y
- 20 dichas combinaciones están expresamente abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Cualquier valor específico indicado anteriormente o en el presente documento se puede combinar con otro valor relacionado indicado anteriormente o en el presente documento para enumerar un intervalo en el que los valores representan los extremos superior e inferior del intervalo, y dichos intervalos están abarcados dentro del alcance de la presente divulgación.
- 25 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101
- 30 y todos los valores intermedios (p. ej., 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Métodos para tratar o inhibir el crecimiento de cánceres

- 35 La presente invención se refiere a métodos para tratar, mejorar o reducir la intensidad de al menos un síntoma o indicio, o inhibir el crecimiento de un cáncer en un sujeto. Los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a PD-1 (como se define en las reivindicaciones) junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico contra MUC16 y CD3 (como se define en las reivindicaciones) a un sujeto que lo necesite. Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" o similares, significan aliviar síntomas, eliminar la causa de los síntomas de forma temporal o permanente, retrasar o inhibir el crecimiento tumoral, reducir la carga de células tumorales o la carga tumoral, promover la regresión tumoral, provocar la reducción, necrosis y/o desaparición del tumor, prevenir la recidiva de tumores y/o aumentar la duración de la supervivencia del sujeto.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "un sujeto que lo necesite" significa un ser humano o mamífero no humano que presenta uno o más síntomas o indicios de cáncer, y/o que ha sido diagnosticado con cáncer, incluido un cáncer de ovario, y que necesita tratamiento para el mismo. En muchas realizaciones, el término "sujeto" puede utilizarse indistintamente con el término "paciente". Por ejemplo, un sujeto humano se puede diagnosticar con un tumor primario o metastásico y/o con uno o más síntomas o indicios que incluyen, pero sin limitación, ganglio(s) linfático(s) agrandado(s), abdomen hinchado, dolor/presión en el pecho, pérdida de peso inexplicable, fiebre, sudores nocturnos, cansancio persistente, pérdida de apetito, agrandamiento del bazo, prurito. La expresión incluye sujetos con tumores de ovario primarios o establecidos. En la invención, la expresión incluye sujetos humanos que tienen y necesitan tratamiento para cáncer de ovario u otro tumor que expresa MUC16. En la invención, los sujetos tienen tumores MUC16+ (por ejemplo, un tumor con expresión de MUC16 determinada por citometría de flujo). En determinadas realizaciones, la expresión "un sujeto que lo necesita" incluye pacientes con un cáncer de ovario que es resistente, refractario o no está controlado adecuadamente mediante un tratamiento previo (por ejemplo, un tratamiento con un agente antineoplásico convencional). Por ejemplo, la expresión incluye sujetos que se han tratado con quimioterapia, tal como un agente quimioterápico a base de platino (por ejemplo, cisplatino) o un compuesto de taxol (por ejemplo, docetaxel). La expresión también incluye sujetos con un tumor de ovario para los que no se aconseja el tratamiento antineoplásico convencional, por ejemplo, debido a los efectos secundarios tóxicos. Por ejemplo, la expresión incluye
- 60 pacientes que han recibido uno o más ciclos de quimioterapia con efectos secundarios tóxicos. En determinadas realizaciones, la expresión "un sujeto que lo necesita" incluye pacientes con un tumor de ovario que se han tratado, pero que posteriormente ha recaído o ha hecho metástasis. Por ejemplo, se tratan pacientes con un tumor de ovario que pueden haber recibido tratamiento con uno o más agentes antineoplásicos que conducen a la regresión del tumor, pero que, posteriormente, han recaído con cáncer resistente a uno o más agentes antineoplásicos (por ejemplo, cáncer resistente a la quimioterapia).
- 65

La expresión "un sujeto que lo necesite" también incluye sujetos que están en riesgo de desarrollar cáncer de ovario, por ejemplo, personas con antecedentes familiares de cáncer de ovario, personas con antecedentes de infecciones asociadas con el cáncer de ovario, personas con mutaciones en los genes *BRCA1/2* o personas con un sistema inmunitario comprometido debido a la infección por VIH o debido a inmunodepresores.

5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar pacientes que muestran niveles elevados de uno o más biomarcadores asociados a cáncer (por ejemplo, el ligando de muerte programada 1 (PD-L1), CA125, proteína epididimaria humana 4 (HE4) y/o antígeno carcinoembrionario (CEA)). Por ejemplo, la presente invención puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo
10 biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un paciente con un nivel elevado de PD-L1 y/o CA125.

En determinadas realizaciones, la presente invención se practica en un sujeto con cáncer de ovario. Los términos "tumor", "cáncer" y "neoplasia maligna" se utilizan de manera indistinta en el presente documento. La expresión "cáncer de ovario", como se usa en el presente documento, se refiere a tumores de ovario y trompas de Falopio, e
15 incluye cáncer seroso, carcinoma endometriode, carcinoma de células claras y carcinoma mucinoso.

De acuerdo con determinadas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos como se define en las reivindicaciones para su uso en métodos para tratar, retrasar o inhibir el crecimiento de un tumor. En determinadas
20 realizaciones, los anticuerpos se utilizan para promover la regresión del tumor. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se utilizan para reducir la carga de células tumorales o carga tumoral. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se utilizan para prevenir la reaparición del tumor. La invención puede comprender administrar de manera secuencial una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto que lo necesite, en donde cada anticuerpo se administra al sujeto en múltiples dosis, por
25 ejemplo, como parte de una pauta posológica terapéutica específica. Por ejemplo, la pauta posológica terapéutica puede comprender administrar una o más dosis del anticuerpo anti-PD-1 al sujeto con una frecuencia de aproximadamente una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada
30 cuatro meses o con menos frecuencia. En determinadas realizaciones, la una o más dosis de anticuerpo anti-PD-1 se administran junto con una o más dosis de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, en donde la una o más dosis de anticuerpo biespecífico se administran al sujeto con una frecuencia de aproximadamente una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez
35 cada cuatro meses o con menos frecuencia.

En determinadas realizaciones, cada dosis del anticuerpo anti-MUC16/anti-CD3 se administra en más de 1 fracción, por ejemplo, en 2 a 5 fracciones ("dosis divididas") dentro del período de dosificación indicado. El anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 se puede administrar en dosis divididas para reducir o eliminar los "picos" de
40 citocinas inducidos en respuesta a la administración del anticuerpo. Los picos de citocinas se refieren a los síntomas clínicos del síndrome de liberación de citocinas ("tormenta de citocinas") y reacciones relacionadas con la infusión. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden administrar una o más dosis de anticuerpo anti-PD-1 junto con una o más dosis del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto que lo necesita, en donde una dosis del anticuerpo biespecífico se administra como dosis divididas, o en más de 1 fracción, por ejemplo, como 2 fracciones, como 3 fracciones, como 4 fracciones o como 5 fracciones dentro del período de dosificación indicado. En determinadas realizaciones, una dosis del anticuerpo biespecífico se divide en 2 o más fracciones, en donde cada fracción comprende una cantidad del anticuerpo igual a las otras fracciones. Por ejemplo, se puede administrar una
45 dosis de anticuerpo anti-MUC16/anti-CD3 que comprende 1000 microgramos una vez a la semana, en donde la dosis se administra en 2 fracciones dentro de la semana, comprendiendo cada fracción 500 microgramos. En determinadas realizaciones, se administra una dosis del anticuerpo biespecífico dividida en 2 o más fracciones, en donde las fracciones comprenden cantidades desiguales del anticuerpo, por ejemplo, mayores o menores que la primera fracción. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de anticuerpo anti-MUC16/anti-CD3 que comprende 1000 microgramos una vez a la semana, en donde la dosis se administra en 2 fracciones dentro de la semana, en donde la primera fracción comprende 700 microgramos y la segunda fracción comprende 300 microgramos. Como otro ejemplo,
50 se puede administrar una dosis de anticuerpo anti-MUC16/anti-CD3 que comprende 1000 microgramos una vez cada 2 semanas, en donde la dosis se administra en 3 fracciones dentro del período de 2 semanas, en donde la primera fracción comprende 400 microgramos, la segunda fracción comprende 300 microgramos y la tercera fracción comprende 300 microgramos.

60 En determinadas realizaciones, los métodos inhiben, retardan o detienen la metástasis tumoral o la infiltración tumoral en órganos periféricos.

En realizaciones específicas, los métodos proporcionan una mayor eficacia antitumoral o una mayor inhibición tumoral. Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto con cáncer de ovario una cantidad terapéuticamente eficaz
65 de un anticuerpo anti-PD-1 antes de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, en donde el anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar aproximadamente 1 día, más de 1 día,

más de 2 días, más de 3 días, más de 4 días, más de 5 días, más de 6 días, más de 7 días o más de 8 días antes del anticuerpo biespecífico. En determinadas realizaciones, los métodos proporcionan una mayor inhibición tumoral, por ejemplo, en aproximadamente un 20 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 % o más del 80 % en comparación con un sujeto al que se le administró el anticuerpo biespecífico antes del anticuerpo anti-PD-1.

En determinadas realizaciones, la presente invención comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-PD-1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico anti-CD3xMUC16 a un sujeto con cáncer de ovario. En realizaciones específicas, el cáncer de ovario es cáncer seroso. En realizaciones adicionales, el cáncer de ovario es de escasa malignidad o agresivo. En determinadas realizaciones, el sujeto no responde al tratamiento anterior o ha recaído después del tratamiento anterior. En determinadas realizaciones, la presente invención comprende además administrar un agente terapéutico adicional al sujeto.

La presente invención comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto con un cáncer MUC16+. En realizaciones específicas, el cáncer es un cáncer de ovario. En realizaciones adicionales, el cáncer de ovario es de escasa malignidad o agresivo. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de ovario resistente al platino. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de ovario resistente a taxol. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de las trompas de Falopio. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer peritoneal primario, opcionalmente en el que el paciente tiene niveles elevados de CA-125 en suero. En realizaciones específicas, el cáncer es cáncer de páncreas (por ejemplo, adenocarcinoma de páncreas). En determinadas realizaciones, el sujeto no responde al tratamiento anterior o ha recaído después del tratamiento anterior (por ejemplo, quimioterapia).

En determinadas realizaciones, la presente invención comprende administrar el anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto que lo necesita como tratamiento de "primera línea" (por ejemplo, tratamiento inicial). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 se administra como tratamiento de "segunda línea" (por ejemplo, después de un tratamiento previo). Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 se administra como tratamiento de "segunda línea" a un sujeto que ha recaído después de un tratamiento previo con, por ejemplo, quimioterapia.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos se utilizan para tratar a un paciente con una enfermedad positiva para LMR. La leucemia mínima residual (LMR) se refiere a pequeñas cantidades de células cancerosas que permanecen en el paciente durante o después del tratamiento, en donde el paciente puede mostrar o no síntomas o signos de la enfermedad. Dichas células cancerosas residuales, si no se eliminan, con frecuencia conducen a una recaída de la enfermedad. La presente invención puede incluir inhibir y/o eliminar células cancerosas residuales en un paciente tras una prueba de LMR. La LMR se puede analizar de acuerdo con métodos conocidos en la materia (por ejemplo, citometría de flujo para LMR).

La invención, de acuerdo con determinadas realizaciones, puede comprender administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno del anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 junto con un tercer agente terapéutico. El tercer agente terapéutico puede ser un agente seleccionado del grupo que consiste en, por ejemplo, radiación, quimioterapia, cirugía, una vacuna contra el cáncer, un inhibidor de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1), un antagonista de LAG3 (por ejemplo, un anticuerpo anti-LAG3), un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4), un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un inhibidor de la Ang2, un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un anticuerpo contra un antígeno específico de tumores (por ejemplo, CA9, CA125, antígeno 3 asociado a melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionario (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de la próstata (AEP), mucina-1, MART-1 y CA19-9), una vacuna (por ejemplo, el bacilo de Calmette-Guerin), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, una citotoxina, un agente quimioterápico, un inhibidor de la IL-6R, un inhibidor de la IL-4R, un inhibidor de la IL-10, una citocina, tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15, un fármaco antiinflamatorio, tal como corticoesteroides, y fármacos antiinflamatorios no esteroides, y un suplemento dietético, tal como los antioxidantes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden administrarse junto con un tratamiento que incluya un agente quimioterápico (por ejemplo, paclitaxel, carboplatino, doxorubicina, ciclofosfamida, cisplatino, gemcitabina o docetaxel), radiación y cirugía. Como se usa en el presente documento, la expresión "junto con" significa que los anticuerpos se administran al sujeto al mismo tiempo, justo antes o justo después de la administración del tercer agente terapéutico. En determinadas realizaciones, el tercer agente terapéutico se administra como una formulación conjunta con los anticuerpos. En una realización relacionada, la presente invención incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto sometido a un régimen terapéutico antineoplásico previo. El régimen terapéutico antineoplásico previo puede comprender un ciclo de administración de, por ejemplo, un agente quimioterápico o radiación. El anticuerpo anti-PD-1 junto con un anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 se puede añadir además del régimen terapéutico antineoplásico previo. En algunas realizaciones, los anticuerpos se añaden como parte de un esquema de "reducción previa", en donde el tratamiento antineoplásico previo se retira gradualmente del sujeto con el tiempo (por ejemplo, de manera escalonada) mientras los anticuerpos se administran

al sujeto a una dosis constante, o a una dosis creciente, o a una dosis decreciente, a lo largo del tiempo.

En determinadas realizaciones, la presente invención comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 junto con una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, en donde la administración de los anticuerpos conduce a una mayor inhibición del crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones, el crecimiento tumoral se inhibe en al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 % en comparación con un sujeto no tratado o un sujeto al que se le administró cualquiera de los anticuerpos como monoterapia. En determinadas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-PD-1 y del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 conduce a una mayor regresión tumoral, reducción y/o desaparición del tumor. En determinadas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-PD-1 y del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 conduce a un retraso en el crecimiento y desarrollo del tumor, por ejemplo, el crecimiento del tumor puede retrasarse aproximadamente 3 días, más de 3 días, aproximadamente 7 días, más de 7 días, más de 15 días, más de 1 mes, más de 3 meses, más de 6 meses, más de 1 año, más de 2 años o más de 3 años en comparación con un sujeto no tratado o un sujeto tratado con cualquiera de los anticuerpos como monoterapia. En determinadas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 previene la reaparición del tumor y/o aumenta la duración de la supervivencia del sujeto, por ejemplo, aumenta la duración de la supervivencia en más de 15 días, más de 1 mes, más de 3 meses, más de 6 meses, más de 12 meses, más de 18 meses, más de 24 meses, más de 36 meses o más de 48 meses que un sujeto no tratado o un sujeto al que se le administra cualquiera de los anticuerpos como monoterapia. En determinadas realizaciones, la administración de los anticuerpos juntos aumenta la supervivencia sin progresión o la supervivencia general. En determinadas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 aumenta la respuesta y la duración de la respuesta en un sujeto, por ejemplo, en más del 2 %, más del 3 %, más del 4 %, más del 5 %, más del 6 %, más del 7 %, más del 8 %, más del 9 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 % o más del 50 % en un sujeto no tratado o un sujeto que ha recibido cualquiera de los anticuerpos como monoterapia. En determinadas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-PD-1 y del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto con cáncer de ovario conduce a la desaparición completa de toda evidencia de células tumorales ("respuesta completa"). En determinadas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto con cáncer de ovario conduce a una disminución de al menos un 30 % o más en las células tumorales o el tamaño del tumor ("respuesta parcial"). En determinadas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-PD-1 y del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto con cáncer de ovario conduce a la desaparición completa o parcial de las células/lesiones tumorales, incluidas nuevas lesiones medibles. La reducción del tumor se puede medir mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, rayos X, tomografía de emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada (TC), formación de imágenes mediante resonancia magnética (RM), citología, histología o análisis genéticos moleculares. En la invención, la administración del anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 produce un efecto antineoplásico sinérgico que supera los efectos combinados de los dos agentes cuando se administran solos.

En determinadas realizaciones, la combinación de anticuerpos administrados es segura y bien tolerada por el paciente y no aumenta ningún efecto secundario adverso (por ejemplo, mayor liberación de citocinas ("tormenta de citocinas") o mayor activación de linfocitos T) en comparación con un paciente al que se le administró el anticuerpo biespecífico como monoterapia.

45 **Anticuerpos anti PD-1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos**

La invención comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en las reivindicaciones. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM). En un anticuerpo normal, cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining regions*), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, del inglés *framework regions*). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En distintas realizaciones de la invención, las FR del anticuerpo (o parte de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de manera natural o artificial. Una secuencia de aminoácidos consenso puede definirse basándose en un análisis en paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usan en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido

o glucoproteína de origen natural, obtenible de manera enzimática, sintético o modificado por ingeniería genética que se une de manera específica a un antígeno para formar un complejo. Pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, mediante cualquier técnica convencional adecuada, tal como digestión proteolítica, o técnicas recombinantes de ingeniería genética que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y, opcionalmente, los constantes, de un anticuerpo. Dicho ADN se conoce y/o se puede adquirir fácilmente de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, fagotecas de anticuerpos) o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer de uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv monocaténario (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades mínimas de reconocimiento que consisten en los restos de aminoácido que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3), o un péptido restringido FR3-CDR3-FR4. Otras moléculas genomanipuladas, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos con dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos con CDR injertadas, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (p. ej., nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, del inglés *small modular immunopharmaceuticals*) y dominios IgNAR variables de tiburón, también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno", como se usa en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que es adyacente o está en el marco con una o más secuencias marco. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden situarse uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener los dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En determinados aspectos de la divulgación, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido de manera covalente a al menos un dominio constante. Configuraciones ilustrativas no limitantes de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; y (xiv) V_L-C_L. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluidas cualquiera de las configuraciones ilustrativas enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos mediante una región bisagra o enlazadora completa o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que producen una unión flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Asimismo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante un enlace (o enlaces) disulfuro).

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse de manera específica a un antígeno diferente o a un epitopo distinto en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico puede adaptarse para su uso en el contexto de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención mediante técnicas habituales disponibles en la materia. Por ejemplo, la presente invención incluye métodos que comprenden el uso de anticuerpos biespecíficos en donde un brazo de una inmunoglobulina es específico para PD-1 o un fragmento del mismo, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para una segunda diana terapéutica o está conjugado con una fracción terapéutica. Los formatos biespecíficos ilustrativos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o de diacuerpo, fusiones IgG-scFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, cuadroma, "botón en ojal", cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con "botones en ojales", etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED) cuerpo, cremallera de leucina, Duocuerpo, IgG1/IgG2, Fab de acción doble (DAF)-IgG y formatos biespecíficos de Mab.sup.2 (véase, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, y las referencias citadas en el mismo, para una revisión de los formatos anteriores). Además, pueden construirse anticuerpos biespecíficos utilizando conjugación de péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en donde se utilizan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados de anticuerpo y oligonucleótido específicos de sitio que después se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane *et al.*, J. Am. Chem. Soc. [Epub: 4 de diciembre de 2012]).

Los anticuerpos usados en la presente invención pueden ser anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes

procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. No obstante, los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en la CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Los anticuerpos usados en la presente invención pueden ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (que se describe con más detalle más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes (que se describe en más detalle posteriormente), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, y están relacionadas con ella, pueden no existir de manera natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La invención utiliza un anticuerpo aislado que se une de manera específica a PD-1. La expresión "se une de manera específica", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Se conocen bien en la materia métodos para determinar si un anticuerpo se une de manera específica a un antígeno e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Por ejemplo, un anticuerpo que "se une de manera específica" a PD-1 incluye anticuerpos que se unen a PD-1 o una porción del mismo con una K_D inferior a aproximadamente 500 nM, inferior a aproximadamente 300 nM, inferior a aproximadamente 200 nM, inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 90 nM, inferior a aproximadamente 80 nM, inferior a aproximadamente 70 nM, inferior a aproximadamente 60 nM, inferior a aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 40 nM, inferior a aproximadamente 30 nM, inferior a aproximadamente 20 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 4 nM, inferior a aproximadamente 3 nM, inferior a aproximadamente 2 nM, inferior a aproximadamente 1 nM o inferior a aproximadamente 0,5 nM, medida en un ensayo con resonancia de plasmón superficial. Un anticuerpo aislado que se une de manera específica a PD-1 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de PD-1 de otras especies (no humanas).

En la invención, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres HCDR (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres LCDR (LCDR1, LCDR2 y LCDR3), en donde la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. Aún en otras realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una HCVR que comprende la SEQ ID NO: 33 y una LCVR que comprende la SEQ ID NO: 34. En determinadas realizaciones, la presente invención comprende el uso de un anticuerpo anti-PD-1, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. Un anticuerpo ilustrativo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 es el anticuerpo anti-PD-1 completamente humano conocido como REGN2810 (también conocido como cemiplimab). De acuerdo con determinadas realizaciones ilustrativas, los métodos de la presente invención comprenden el uso de REGN2810 o un bioequivalente del mismo. El término "bioequivalente", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos anti-PD-1 o a proteínas de unión a PD-1 o a fragmentos de los mismos que son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y/o grado de absorción no muestran una diferencia significativa con los de REGN2810 cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, bien en una sola dosis o en múltiples dosis. En el contexto de la invención, el término se refiere a proteínas de unión a antígeno que se unen a PD-1, que no tienen diferencias clínicamente significativas con REGN2810 en cuanto a su seguridad, pureza y/o potencia.

Los anticuerpos anti-IL-PD-1 utilizados pueden tener características de unión dependientes del pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en la presente invención puede presentar una unión reducida a PD-1 a pH ácido en comparación con el pH neutro. Como alternativa, un anticuerpo anti-PD-1 puede presentar una unión mejorada a su

antígeno a pH ácido en comparación con el pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH inferiores a aproximadamente 6,2, por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 o inferior. Como se usa en el presente documento, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

En determinados casos, "unión reducida a PD-1 a pH ácido en comparación con pH neutro" se expresa en términos de una proporción del valor de K_D del anticuerpo que se une a PD-1 a pH ácido con respecto al valor de K_D del anticuerpo que se une a PD-1 a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede considerarse que presenta "unión reducida a PD-1 a pH ácido en comparación con pH neutro" para los fines de la presente invención si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta una proporción de K_D ácida/neutra de aproximadamente 3,0 o superior. En determinadas realizaciones ilustrativas, la proporción de K_D ácida/neutra para un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención puede ser de aproximadamente 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 o superior.

Se pueden obtener anticuerpos con características de unión dependientes del pH, por ejemplo, mediante la selección en una población de anticuerpos de unión reducida (o mejorada) a un antígeno particular a pH ácido en comparación con pH neutro. Adicionalmente, las modificaciones del dominio de unión a antígeno a nivel de aminoácidos pueden producir anticuerpos con características dependientes del pH. Por ejemplo, mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) con un resto de histidina, puede obtenerse un anticuerpo con unión a antígeno reducida a pH ácido en relación con el pH neutro. Como se usa en el presente documento, la expresión "pH ácido" significa un pH de 6,0 o inferior.

25 **Anticuerpos biespecíficos anti-MUC16/anti-CD3**

La invención también comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico que se une de manera específica a CD3 y MUC16. En el presente documento dichos anticuerpos pueden denominarse, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos "anti-MUC16/anti-CD3", o "anti-MUC16xCD3", o "MUC16xCD3" u otra terminología similar.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a una proteína inmunoglobulina que comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno. En el contexto de la presente invención, el primer dominio de unión a antígeno se une de manera específica a un primer antígeno (por ejemplo, MUC16), y el segundo dominio de unión a antígeno se une de manera específica a un segundo antígeno distinto

(por ejemplo, CD3). Cada dominio de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada (HCVR) y un dominio variable de cadena ligera (LCVR), comprendiendo cada uno de ellos tres CDR. En el contexto de un anticuerpo biespecífico, las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo "A" y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo "B". Por tanto, en el presente documento las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden denominarse A-HCDR1, A-HCDR2 y A-HCDR3; y, en el presente documento, las CDR del segundo dominio de unión a antígeno pueden denominarse B-HCDR1, B-HCDR2 y B-HCDR3.

El primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno están unidos cada uno a un dominio de multimerización separado. Como se usa en el presente documento, un "dominio de multimerización" es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido o aminoácido que tiene la capacidad de asociarse con un segundo dominio de multimerización de la misma estructura o constitución o similar. En el contexto de la presente invención, el componente de multimerización es una parte Fc de una inmunoglobulina (que comprende un dominio C_{H2} - C_{H3}), por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo.

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención normalmente comprenden dos dominios de multimerización, por ejemplo, dos dominios Fc que son cada uno de manera individual parte de una cadena pesada de anticuerpo separada. El primer y el segundo dominio de multimerización pueden ser del mismo isotipo de IgG, tal como, por ejemplo, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Como alternativa, el primer y el segundo dominio de multimerización pueden ser de diferentes isotipos de IgG, tales como, por ejemplo, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4, etc.

Puede utilizarse cualquier formato o tecnología de anticuerpo biespecífico para preparar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una primera especificidad de unión a antígeno puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica. Los formatos biespecíficos ilustrativos específicos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv

o de diacuerpo, fusiones IgG-scFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, cuadroma, "botón en ojal", cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con "botones en ojal", etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)cuerpo, cremallera de leucina, Duocuerpo, IgG1/IgG2, Fab de acción doble (DAF)-IgG y formatos biespecíficos de Mab₂ (véase, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, y las referencias citadas en el mismo, para una revisión de los formatos anteriores).

5 En el contexto de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, los dominios Fc pueden comprender uno o más cambios de aminoácidos (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o sustituciones) en comparación con la versión de origen natural y de tipo silvestre del dominio Fc. Por ejemplo, la invención incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden una o más modificaciones en el dominio Fc que dan como resultado un dominio Fc modificado que tiene una interacción de unión modificada (por ejemplo, mejorada o disminuida) entre Fc y FcRn. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende una modificación en una región C_{H2} o C_{H3}, en donde la modificación aumenta la afinidad del dominio Fc por FcRn en un ambiente ácido (*por ejemplo*, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Se divulgan ejemplos no limitantes de dichas modificaciones de Fc en la publicación de patente estadounidense n.º 20150266966.

15 La presente invención también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio C_{H3} y un segundo dominio C_{H3} de Ig, en donde el primer y el segundo dominio C_{H3} de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una realización, el primer dominio C_{H3} de Ig está unido a proteína A y el segundo dominio C_{H3} de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a proteína A, tal como una modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). El segundo C_{H3} puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 8.586.713. Otras modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo C_{H3} incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG4.

30 En determinadas realizaciones, el dominio Fc puede ser quimérico, que combina secuencias de Fc procedentes de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc quimérico puede comprender parte o la totalidad de una secuencia C_{H2} procedente de una región C_{H2} de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y parte o la totalidad de una secuencia C_{H3} procedentes de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un dominio Fc quimérico también puede contener una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de "bisagra superior", procedente de una región bisagra de una IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, junto con una secuencia de "bisagra inferior", procedente de una región bisagra de una IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana. Un ejemplo particular de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno establecidas en el presente documento comprende, desde el extremo N al extremo C: [C_{H1} de IgG4]-[bisagra superior de IgG4]-[bisagra inferior de IgG2]-[CH2 de IgG4]-[CH3 de IgG4]. Otro ejemplo de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno establecidas en el presente documento comprende, desde el extremo N al extremo C: [C_{H1} de IgG1]-[bisagra superior de IgG1]-[bisagra inferior de IgG2]-[CH2 de IgG4]-[CH3 de IgG1]. Estos y otros ejemplos de dominios Fc quiméricos que pueden incluirse en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención se describen en la publicación de Estados Unidos n.º 20140243504. Los dominios Fc quiméricos que tienen estas disposiciones estructurales generales y variantes de los mismos, pueden tener alterada la unión al receptor de Fc, que a su vez afecta la función efectora de Fc.

50 En la invención, la A-HCDR1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; la A-HCDR2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; la A-HCDR3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; la A-LCDR1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; la A-LCDR2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; la A-LCDR3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; la B-HCDR1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; la B-HCDR2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y la B-HCDR3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y la B-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; la B-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; la B-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En otras realizaciones, la A-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; la A-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; la A-HCDR3 puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; la A-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; la A-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; la A-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; la B-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; la B-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; y la B-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; y la B-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; la B-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; la B-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Aún en otras realizaciones, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) un primer brazo de unión a antígeno que comprende una HCVR (A-HCVR) que comprende la SEQ ID NO: 1 y una LCVR (A-LCVR) que comprende la SEQ ID NO: 2; y (b) un segundo brazo de unión a antígeno que comprende una HCVR (B-HCVR) que comprende la SEQ ID NO: 3 o la SEQ

ID NO: 7, y una LCVR (B-LCVR) que comprende la SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo biespecífico anti-CD3xMUC16 comprende un brazo de unión a MUC16 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En determinadas realizaciones ilustrativas, el anticuerpo biespecífico anti-CD3xMUC16 comprende un brazo de unión a MUC16 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y un brazo de unión a CD3 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

En determinadas realizaciones, la actividad antitumoral de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3xMUC16 de la presente invención no se ve sustancialmente impedida por la presencia de niveles elevados (por ejemplo, hasta 10.000 U/ml) de CA125 circulante. Los niveles en suero de CA125 aumentan en el suero de la mayoría de las pacientes con cáncer de ovario (los niveles medios publicados son aproximadamente 656 U/ml). Como se demuestra en el ejemplo 2, a continuación, niveles elevados de CA125 en suero o ascitis no interferirán significativamente con el perfil antitumoral de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención.

20 **Combiterapias**

La presente invención comprende administrar al sujeto el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 junto con el anticuerpo anti-PD-1. Como se usa en el presente documento, la expresión "junto con" significa que el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 se administra antes, después o al mismo tiempo que el anticuerpo anti-PD-1. La expresión "junto con" también incluye la administración secuencial o simultánea de un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. Por ejemplo, cuando se administra "antes" del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, el anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar durante más de 150 horas, aproximadamente 150 horas, aproximadamente 100 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 15 minutos o aproximadamente 10 minutos antes de la administración del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. Cuando se administra "después" del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, el anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas o más de 72 horas después de la administración del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. La administración "simultánea" con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 significa que el anticuerpo anti-PD-1 se administra al sujeto en una forma farmacéutica separada en menos de 5 minutos (antes, después o al mismo tiempo) de la administración del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, o se administra al sujeto como una formulación de dosificación única combinada que comprende tanto el anticuerpo anti-PD-1 como el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3.

En determinadas realizaciones, se puede administrar un tercer agente terapéutico, en donde el tercer agente terapéutico es un agente antineoplásico. Como se usa en el presente documento, "fármaco antineoplásico" significa cualquier agente útil para tratar el cáncer que incluye, pero sin limitación, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimitóticos, procarbazona, hidroxiurea, asparaginasa, corticoesteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), productos biológicos (por ejemplo, anticuerpos e interferones) y agentes radiactivos. Como se usa en el presente documento, "una citotoxina o agente citotóxico", también se refiere a un agente quimioterapéutico y significa cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen Taxol® (paclitaxel), temozolamida, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, cisplatino, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

En determinadas realizaciones, se puede administrar un tercer agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en radiación, cirugía, una vacuna contra el cáncer, un inhibidor de PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1), un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un antagonista de otro coinhibidor o ligando de linfocitos T (por ejemplo, un anticuerpo contra CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 o VISTA), un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [por ejemplo, una "trampa de VEGF", tal como aflibercept, u otra proteína de fusión inhibidora de VEGF como se establece en la patente de Estados Unidos n.º 7.087.411 o un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, bevacizumab, o ranibizumab) o un inhibidor de cinasa de molécula pequeña del receptor de VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib o pazopanib)], un inhibidor de Ang2 (por ejemplo, nesvacumab), un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), un inhibidor del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, erlotinib, cetuximab), un agonista de un receptor coestimulador (por ejemplo, un agonista de la proteína relacionada con TNFR inducida por

glucocorticoides), un anticuerpo contra un antígeno específico de tumores (por ejemplo, CA9, CA125, antígeno 3 asociado a melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionario (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de la próstata (AEP), mucina-1, MART-1 y CA19-9), una vacuna (por ejemplo, bacilo de Calmette-Guerin, una vacuna contra el cáncer), un adyuvante para aumentar la presentación de antígenos (por ejemplo, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos), una citotoxina, un agente quimioterápico (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, cisplatino, carboplatino, gemcitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel y vincristina), radioterapia, un inhibidor de IL-6R (por ejemplo, sarilumab), un inhibidor de IL-4R (por ejemplo, dupilumab), un inhibidor de la IL-10, una citocina, tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15, un conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF) (por ejemplo, CAF anti-CD19-DM4 y CAF anti-DS6-DM4), linfocitos T receptores de antígeno quimérico (por ejemplo, linfocitos T dirigidos a CD19), un medicamento antiinflamatorio (por ejemplo, corticoesteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos) y un suplemento dietético, tal como los antioxidantes.

En determinadas realizaciones, la invención comprende administrar el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 junto con radioterapia para generar respuestas antitumorales duraderas a largo plazo y/o mejorar la supervivencia de pacientes con cáncer.

En algunas realizaciones, la invención comprende administrar radioterapia antes, de manera simultánea o después de administrar el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un paciente con cáncer. Por ejemplo, la radioterapia se puede administrar en una o más dosis a las lesiones tumorales seguida de la administración de una o más dosis de los anticuerpos. En algunas realizaciones, la radioterapia se puede administrar de manera local a una lesión tumoral para potenciar la inmunogenia local del tumor de un paciente (radiación adyuvante) y/o para destruir las células tumorales (radiación ablativa) seguida de la administración sistémica del anticuerpo anti-PD-1 y/o el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden administrarse junto con radioterapia y un agente quimioterápico (por ejemplo, carboplatino y/o paclitaxel) o un antagonista de VEGF (por ejemplo, aflibercept).

Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención incluye administrar el anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto en donde los anticuerpos están contenidos en una composición farmacéutica separada o combinada (única). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, administración, tolerancia y similares adecuados. Se puede encontrar una multitud de formulaciones adecuadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Véase también Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía subcutánea o por vía intravenosa con una aguja y una jeringa convencionales. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo inyector de pluma tiene fácilmente aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo inyector de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo inyector de pluma reutilizable utiliza generalmente un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y sustituirse por un nuevo cartucho que contenga la composición farmacéutica. El dispositivo inyector de pluma puede entonces reutilizarse. En un dispositivo inyector de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo inyector de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica contenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba. En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos; véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana de la

composición, lo que requiere solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138). Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

5 Las preparaciones inyectables pueden incluir formas farmacéuticas para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, mediante disolución, suspensión o emulsión del anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso utilizado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros coadyuvantes, etc., que puede utilizarse junto con un agente solubilizante adecuado, tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que puede usarse junto con un agente solubilizante, tal como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección así preparada se carga preferentemente en una ampolla apropiada.

De manera ventajosa, las composiciones farmacéuticas para su uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc.

Pautas posológicas

La presente invención puede incluir administrar a un sujeto el anticuerpo anti-PD-1 con una frecuencia de dosificación de aproximadamente cuatro veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada doce semanas o con menos frecuencia siempre que se logre una respuesta terapéutica. En determinadas realizaciones, la presente invención incluye administrar a un sujeto el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 con una frecuencia de dosificación de aproximadamente cuatro veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada doce semanas o con menos frecuencia siempre que se logre una respuesta terapéutica. En determinadas realizaciones, los métodos implican la administración del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 con una frecuencia de dosificación de aproximadamente cuatro veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada doce semanas o con menos frecuencia siempre que se logre una respuesta terapéutica.

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, pueden administrarse múltiples dosis del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto durante un periodo de tiempo definido. Los métodos pueden comprender administrar de manera secuencial a un sujeto una o más dosis del anticuerpo anti-PD-1 junto con una o más dosis del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. Como se usa en el presente documento, "administrar de manera secuencial" significa que cada dosis del anticuerpo se administra al sujeto en un punto temporal diferente, por ejemplo, en días distintos separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar de manera secuencial al paciente una dosis inicial única del anticuerpo anti-PD-1, seguida por una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-PD-1 y, opcionalmente, seguidas por una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-PD-1. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además administrar de manera secuencial al paciente una única dosis inicial del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, seguida por una o más dosis secundarias del anticuerpo biespecífico y, opcionalmente, seguidas de una o más dosis terciarias del anticuerpo biespecífico.

De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, pueden administrarse múltiples dosis del anticuerpo anti-PD-1 y del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a un sujeto durante un periodo de tiempo definido. Los métodos pueden comprender administrar de manera secuencial a un sujeto múltiples dosis del anticuerpo anti-PD-1 y del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. Como se usa en el presente documento, "administrar de manera secuencial" significa que cada dosis del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico se administra al sujeto en un momento temporal diferente, por ejemplo, en días distintos separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses).

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias", y "dosis terciarias" se refieren a la secuencia temporal de administración. Por tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al inicio de la pauta terapéutica (también denominada "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundaria y terciaria pueden contener todas la misma cantidad del anticuerpo (anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo biespecífico). En determinadas realizaciones, sin embargo, la cantidad contenida en las dosis iniciales, secundarias

y/o terciarias varían entre sí (por ejemplo, se ajustan al alza o a la baja según corresponda) durante el transcurso del tratamiento. En determinadas realizaciones, una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) dosis se administran al principio de la pauta terapéutica como "dosis de carga", seguidas de dosis posteriores que se administran con menor frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento"). Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo anti-PD-1 a un paciente con

5 cáncer de ovario a una dosis de carga de aproximadamente 1 a 3 mg/kg seguida de una o más dosis de mantenimiento de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del paciente.

En una realización ilustrativa de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1/2 a 14 (por ejemplo, 1/2, 1, 1 1/2, 2, 2 1/2, 3, 3 1/2, 4, 4 1/2, 5, 5 1/2, 6, 6 1/2, 7, 7 1/2, 8, 8 1/2, 9, 9 1/2, 10, 10 1/2, 11, 11 1/2, 12, 12 1/2, 13, 13 1/2, 14, 14 1/2 o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La expresión "la dosis inmediatamente anterior", como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de anticuerpo anti-PD-1 (y/o anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3) que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

10

Los métodos pueden comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundarias y/o terciarias del anticuerpo anti-PD-1 (y/o anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, al paciente se le administra únicamente una sola dosis secundaria. En otras realizaciones, al paciente se le administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. Asimismo, en determinadas realizaciones, al paciente se le administra únicamente una sola dosis terciaria. En otras realizaciones, al paciente se le administran dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias.

15
20

En realizaciones que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente de 1 a 2 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en realizaciones que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria puede administrarse con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede administrarse al paciente de 2 a 4 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. Como alternativa, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar en el transcurso de la pauta de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ajustarla un médico en el transcurso del tratamiento, dependiendo de las necesidades del paciente individual después del examen clínico.

25
30

En determinadas realizaciones, una o más dosis del anticuerpo anti-PD-1 y/o anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 se administran al comienzo de una pauta terapéutica como "dosis de inducción" con más frecuencia (dos veces a la semana, una vez a la semana o una vez cada 2 semanas) seguidas por dosis posteriores ("dosis de consolidación" o "dosis de mantenimiento") que se administran con menos frecuencia (por ejemplo, una vez cada 4 a 12 semanas).

35

La presente invención incluye la administración secuencial del anticuerpo anti-PD-1 junto con el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 a una paciente para tratar un cáncer de ovario (por ejemplo, cáncer seroso). En algunas realizaciones, los presentes métodos comprenden administrar una o más dosis del anticuerpo anti-PD-1 seguida de una o más dosis del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. En determinadas realizaciones, los presentes métodos comprenden administrar una dosis única del anticuerpo anti-PD-1 seguida de una o más dosis del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3. En algunas realizaciones, pueden administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg del anticuerpo anti-PD-1 seguido de una o más dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg del anticuerpo biespecífico para inhibir el crecimiento tumoral y/o prevenir la reaparición del tumor en un sujeto con cáncer de ovario. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se administra en una o más dosis seguidas de una o más dosis del anticuerpo biespecífico, lo que da como resultado una mayor eficacia antitumoral (por ejemplo, mayor inhibición del crecimiento tumoral, mayor prevención de la reaparición del tumor en comparación con un sujeto no tratado o un sujeto al que se le administró cualquiera de los anticuerpos como monoterapia). Realizaciones alternativas de la invención se refieren a la administración simultánea del anticuerpo anti-PD-1 y del anticuerpo biespecífico que se administra en una dosis separada con una frecuencia similar o diferente con respecto al anticuerpo anti-PD-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se administra antes, después o al mismo tiempo que el anticuerpo anti-PD-1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se administra como una formulación de dosificación única con el anticuerpo anti-PD-1.

40
45
50

55 Posología

La cantidad de anticuerpo anti-PD-1 y/o anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 administrado a un sujeto de acuerdo con la presente invención es, en general, una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de anticuerpo (anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3) que da como resultado uno o más de: (a) una reducción en la intensidad o duración de un síntoma de un cáncer (por ejemplo, cáncer de ovarios); (b) inhibición del crecimiento tumoral o aumento de la necrosis tumoral, reducción tumoral y/o desaparición del tumor; (c) retraso en el crecimiento y desarrollo del tumor; (d) inhibir, retardar o detener la metástasis tumoral; (e) prevención de la recidiva del crecimiento tumoral; (f) aumento de la supervivencia de un sujeto con cáncer (por ejemplo, cáncer de ovarios); y/o (g) una reducción en el uso o la necesidad de tratamiento contra el cáncer convencional (por ejemplo, uso reducido o eliminado de agentes quimioterápicos o citotóxicos) en comparación con un sujeto no tratado o un sujeto al que se le administró

60
65

cualquiera de los anticuerpos como monoterapia.

En el caso de un anticuerpo anti-PD-1, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 600 mg, por ejemplo, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1,0 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 510 mg, aproximadamente 520 mg, aproximadamente 530 mg, aproximadamente 540 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 560 mg, aproximadamente 570 mg, aproximadamente 580 mg, aproximadamente 590 mg o aproximadamente 600 mg del anticuerpo anti-PD-1. En determinadas realizaciones, se administran 250 mg de un anticuerpo anti-PD-1.

En el caso de un anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 10 microgramos (μg) a aproximadamente 8000 μg , por ejemplo, aproximadamente 10 μg , aproximadamente 20 μg , aproximadamente 50 μg , aproximadamente 70 μg , aproximadamente 100 μg , aproximadamente 120 μg , aproximadamente 150 μg , aproximadamente 200 μg , aproximadamente 250 μg , aproximadamente 300 μg , aproximadamente 350 μg , aproximadamente 400 μg , aproximadamente 450 μg , aproximadamente 500 μg , aproximadamente 550 μg , aproximadamente 600 μg , aproximadamente 700 μg , aproximadamente 800 μg , aproximadamente 900 μg , aproximadamente 1000 μg , aproximadamente 1050 μg , aproximadamente 1100 μg , aproximadamente 1500 μg , aproximadamente 1700 μg , aproximadamente 2000 μg , aproximadamente 2050 μg , aproximadamente 2100 μg , aproximadamente 2200 μg , aproximadamente 2500 μg , aproximadamente 2700 μg , aproximadamente 2800 μg , aproximadamente 2900 μg , aproximadamente 3000 μg , aproximadamente 4000 μg , aproximadamente 5000 μg , aproximadamente 6000 μg , aproximadamente 7000 μg o aproximadamente 8000 μg del anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3.

La cantidad de anticuerpo anti-PD-1 o de anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 contenida en las dosis individuales puede expresarse en términos de miligramos de anticuerpo por kilogramo de peso corporal del sujeto (es decir, mg/kg). En determinadas realizaciones, puede administrarse a un sujeto el anticuerpo anti-PD-1 o el anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 utilizado en la presente invención a una dosis de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del paciente. El anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del paciente.

A continuación, en la tabla 1 se muestra un sumario de las secuencias y las SEQ ID NO correspondientes a las que se hace referencia en el presente documento.

Tabla 1: Sumario de secuencias

SEQ ID NO:	Descripción
1	Región variable de cadena pesada anti-MUC16
2	Región variable de cadena ligera anti-MUC16 y anti-CD3
3	Región variable de cadena pesada anti-CD3-G
4	Región variable de cadena pesada anti-CD3-G5
5	Región variable de cadena pesada anti-CD3-G9
6	Región variable de cadena pesada anti-CD3-G10
7	Región variable de cadena pesada anti-CD3-G20
8	HCDR1 anti-MUC16
9	HCDR2 anti-MUC16
10	HCDR3 anti-MUC16
11	LCDR1 anti-MUC16 y anti-CD3
12	LCDR2 anti-MUC16 y anti-CD3
13	LCDR3 anti-MUC16 y anti-CD3
14	HCDR1 anti-CD3-G
15	HCDR2 anti-CD3-G
16	HCDR3 anti-CD3-G

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción
17	HCDR1 anti-CD3-G5
18	HCDR2 anti-CD3-G5
19	HCDR3 anti-CD3-G5
20	HCDR1 anti-CD3-G9
21	HCDR2 anti-CD3-G9
22	HCDR3 anti-CD3-G9
23	HCDR1 anti-CD3-G10
24	HCDR2 anti-CD3-G10
25	HCDR3 anti-CD3-G10
26	HCDR1 anti-CD3-G20
27	HCDR2 anti-CD3-G20
28	HCDR3 anti-CD3-G20
29	Cadena pesada anti-MUC16
30	Cadena ligera anti-MUC16 y anti-CD3
31	Cadena pesada anti-CD3-G
32	Cadena pesada anti-CD3-G20
33	Región variable de cadena pesada anti-PD-1
34	Región variable de cadena ligera anti-PD-1
35	HCDR1 anti-PD-1
36	HCDR2 anti-PD-1
37	HCDR3 anti-PD-1
38	LCDR1 anti-PD-1
39	LCDR2 anti-PD-1
40	LCDR3 anti-PD-1
41	Cadena pesada anti-PD-1
42	Cadena ligera anti-PD-1

Ejemplos

- 5 Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de proporcionar a las personas normalmente versadas en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y utilizar los métodos y las composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos biespecíficos que se unen a células específicas de ovario (MUC16) y CD3

15 La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a CD3 y MUC16; dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas también se denominan en el presente documento "moléculas biespecíficas anti-MUC16/anti-CD3 o anti-MUC16xCD3". La parte anti-MUC16 de la molécula biespecífica anti-MUC16/anti-CD3 es útil para dirigirse a las células tumorales que expresan MUC16 (también conocida como CA-125), y la parte anti-CD3 de la molécula biespecífica es útil para activar los linfocitos T. La unión simultánea de MUC16 en una célula tumoral y CD3 en un linfocito T facilita la destrucción dirigida (lisis celular) de la célula tumoral diana por parte del linfocito T activado.

25 Se construyeron anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio de unión específico anti-MUC16 y un dominio de unión específico anti-CD3 mediante metodologías convencionales, en donde el dominio de unión a antígeno anti-MUC16 y el dominio de unión a antígeno anti-CD3 comprenden cada uno HCVR diferentes y distintas emparejadas con una LCVR común. En los anticuerpos biespecíficos ilustrados, las moléculas se construyeron mediante una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3, una cadena pesada de un anticuerpo anti-MUC16 y una cadena ligera común del anticuerpo anti-MUC16. En otros casos, los anticuerpos biespecíficos pueden construirse mediante una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3, una cadena pesada de un anticuerpo anti-MUC16 y una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 o una cadena ligera de anticuerpo conocida por ser promiscua o emparejarse eficazmente con una variedad de brazos de cadena pesada.

35 Los anticuerpos biespecíficos ilustrados se fabricaron con un dominio Fc de IgG1 (BSMUC16/CD3-001, -002, -003 y -004) o un dominio Fc de IgG4 modificado (quimérico) (BSMUC16/CD3-005) como se expone en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US20140243504A1, publicada el 28 de agosto de 2014.

En la tabla 2 se muestra un resumen de las partes constituyentes de los dominios de unión a antígeno de los diferentes anticuerpos biespecíficos anti-MUC16xCD3 construidos.

Tabla 2: Resumen de las partes constituyentes de anticuerpos biespecíficos anti-MUC16xCD3

Identificador de anticuerpo biespecífico	Anti-MUC16	Anti-CD3	Región variable de cadena ligera común
	Dominio de unión a antígeno	Dominio de unión a antígeno	
	Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena pesada	
BSMUC16/CD3-001	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G (SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 2)
BSMUC16/CD3-002	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G5 (SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 2)
BSMUC16/CD3-003	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G9 (SEQ ID NO: 5)	(SEQ ID NO: 2)
BSMUC16/CD3-004	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G10 (SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 2)
BSMUC16/CD3-005	(SEQ ID NO: 1)	CD3-VH-G20 (SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 2)

5

Ejemplo 2: CA-125 no interfiere con la actividad del anticuerpo anti-MUC16xCD3 *in vitro*

El impacto de CA-125 soluble (la forma eliminada de MUC16) en la actividad de BSMUC16/CD3-001 se evaluó mediante ensayos de citotoxicidad y unión de FACS en presencia de niveles elevados de CA-125 purificado de ascitis de pacientes con cáncer de ovario. Los niveles de CA-125 aumentan en el suero de la mayoría de las pacientes con cáncer de ovario y los niveles circulantes podrían afectar cualquier tratamiento dirigido a MUC16 al actuar como un receptor de antígenos. Los niveles de CA-125 utilizados en el ensayo (10.000 U/ml) superan con creces la mediana de los niveles publicados de 656,6 U/ml en pacientes con cáncer de ovario. La capacidad de BSMUC16/CD3-001 para destruir células OVCAR-3 que expresan MUC16 en presencia de CA-125 soluble enriquecido a partir de ascitis humana (creative Biomart, NY, EE. UU.) o una construcción proximal a la membrana que expresa los cinco dominios SEA carboxiterminales y la región yuxtamembrana de MUC16 (MUC16 Δ) se llevó a cabo en una relación efector/diana de 4:1 con una concentración fija de BSMUC16/CD3-001 o anticuerpo de control de unión a CD3 (100 pM) y una dilución en serie de MUC16-1H o MUC16 Δ durante 72 horas a 37 °C. Para controlar la destrucción específica de las células diana portadoras de MUC16, las células OVCAR-3 se marcaron con 1 μ M de Violet CellTracker. Después del marcaje, las células se sembraron en placas durante la noche a 37 °C. Por separado, se sembraron en placas PBMC humanas en medio RPMI complementado a 1 \times 10⁶ células/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para enriquecer los linfocitos mediante el agotamiento de células adherentes. Al día siguiente, las células diana se incubaron conjuntamente con PBMC indiferenciadas empobrecidas en células adherentes (relación de células efectoras/diana 4:1) y una dilución en serie de BSMUC16/CD3-001 o el control de unión a CD3 durante 72 horas a 37 °C. Las células se eliminaron de las placas de cultivo celular mediante tripsina y se analizaron mediante FACS. Para el análisis por FACS, las células se tiñeron con un rastreador de glóbulos rojos muertos/vivos (Invitrogen). Para la evaluación de la especificidad de destrucción, las células se seleccionaron en poblaciones marcadas con Violet CellTracker. El porcentaje de células diana vivas se indicó para el cálculo de supervivencia ajustada como sigue: Supervivencia ajustada = (R1/R2) \times 100, donde R1 = % de células diana vivas en presencia de anticuerpo, y R2 = % de células diana vivas en ausencia de anticuerpo de ensayo. La activación de los linfocitos T se evaluó mediante la incubación de células con anticuerpos directamente conjugados contra CD2, CD69 y/o CD25, e informando del porcentaje de linfocitos T activados (CD69+) y/o linfocitos T (CD25+) del total de linfocitos T (CD2+).

La unión de BSMUC16/CD3-001 y un anticuerpo que se sabe que une CA-125 (clon 3A5) a CA125 obtenido del líquido ascítico humano se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En resumen, CA-125 soluble (creative Biomart, NY, EE. UU.) a una concentración de 4000 unidades/ml en PBS se adsorbió pasivamente en placas de microvaloración de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. A continuación, se lavaron las placas con PBST y se bloquearon con BSA al 0,5 % en PBS durante 1 hora. Se añadieron a la placa BSMUC16/CD3-001 biotinilado, el anticuerpo parental MUC16, a-MUC16 3A5 y controles no unidos (control de isotipo BSMUC16/CD3-001 y control de isotipo a-MUC16 3A5), en concentraciones de 10, 1, 0,3 o 0,1 nM en BSA al 0,5 % en PBS durante 1 hora, seguido de un lavado con PBST. Se añadió a los pocillos estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (SA-HRP) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una dilución 1:10000 de una solución madre de 1,0 mg/ml y se incubó durante 1 hora para detectar anticuerpos biotinilados unidos a la placa. La placa se lavó y se reveló con sustrato de 3-3',5-5'-tetrametilbencidina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se registró la absorbancia a 450 nm para cada pocillo en un lector de placas Victor Multilabel (Perkin Elmer, Melville, NY). Los datos se analizaron con el programa informático GraphPad Prism.

El exceso de CA-125 tuvo un impacto mínimo en la unión de BSMUC16/CD3-001 a las células OVCAR-3, lo que sugiere una unión mínima a CA-125 (Figura 1). Por el contrario, CA-125 inhibió en gran medida la capacidad de un anticuerpo comparador que probablemente se une a la región repetida de MUC16 (versión interna del clon de

50

anticuerpo 3A) (Figura 1). Además, una construcción MUC16 soluble que contiene la región proximal a la membrana hasta el 5.º dominio SEA de MUC16 (MUC16Δ) inhibió drásticamente la unión de BSMUC16/CD3-001, lo que mostró que BSMUC16/CD3-001 se une a una región proximal de la membrana, como se analiza con mayor detalle en el documento WO 2018/067331.

En consonancia con los estudios de unión, BSMUC16/CD3-001 también podría inducir la destrucción mediada por linfocitos T en presencia de CA-125, pero no en presencia de una concentración elevada de MUC16Δ (datos no mostrados). Por tanto, BSMUC16/CD3-001 puede unirse a MUC16 e inducir la destrucción redirigida por linfocitos T incluso en presencia de concentraciones elevadas de CA-125.

Ejemplo 3: El bloqueo de PD-1 mejora la actividad antitumoral de los anticuerpos biespecíficos anti-MUC16xCD3 en modelos de tumores xenogénicos y singénicos

Se evaluó la eficacia *in vivo* de un anticuerpo biespecífico anti-MUC16/anti-CD3 junto con el bloqueo de PD-1 en modelos tumorales xenogénicos y singénicos.

A. Modelo xenogénico - OVCAR-3/Luc

Para el modelo xenogénico, a los ratones NSG inmunodeficientes se les inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) células OVCAR-3/Luc pasadas previamente *in vivo* (Día 0) trece días después del injerto con PBMC humanas. Los ratones se trataron por vía i.p. con 12,5 µg/ratón de BSMUC16/CD3-001, o se les administró 12,5 µg de control de unión a CD3 solo o junto con 100 µg de REGN2810 los días 5 y 8. La carga tumoral se evaluó mediante BLI los días 4, 8, 12, 15, 20 y 25 después de la implantación del tumor. Según lo determinado por las mediciones de BLI el día 25, el tratamiento con 12,5 µg de BSMUC16/CD3-001 dio como resultado una eficacia antitumoral significativa según lo determinado por mediciones de BLI y la combinación con REGN2810 (anti-PD-1) mejoró aún más la eficacia antitumoral. Todos los grupos tenían una carga tumoral similar según lo evaluado por BLI antes de que comenzara la dosificación. No hubo diferencias significativas en la carga tumoral entre los grupos.

BSMUC16/CD3-001 reduce significativamente la carga tumoral a 12,5 µg y la adición de anti-PD-1 mejora la eficacia antitumoral respecto a la de BSMUC16/CD3-001 solo. A los ratones NSG injertados con linfocitos T humanos se les implantaron células OVCAR-3/Luc humanas. Los ratones se trataron los días 5 y 8 con 12,5 µg de BSMUC16/CD3-001 administrados por vía intravenosa o se trataron con un control que se une a CD3 o un control que no se une (12,5 µg i.v.). Los datos que se muestran en la tabla 3 a continuación son la carga tumoral evaluada por BLI el día 25 después de la implantación del tumor. La significación estadística se determinó mediante pruebas t de Mann-Whitney no paramétricas para datos independientes. El tratamiento con BSMUC16/CD3-001 +/- REGN2810 se comparó con el control de unión a CD3 (* p <0,05 para BSMUC16/CD3-001, ** p <0,01 para BSMUC16/CD3-001 y REGN2810) y el tratamiento con BSMUC16/CD3-001 solo se comparó con la combinación con REGN2810 (n.º p <0,05).

Tabla 3: Bioluminiscencia en el día 25 después de la implantación del tumor

Anticuerpo (µg)	Radiancia promedio [p/s/cm²/sr] 25 días después de la implantación (mediana ± EEM)
Control de unión a CD3 hlgG4P-PVA (12)	$7,71 \times 10^6 \pm 1,07 \times 10^6$
BSMUC16/CD3-001 (12)	$7,44 \times 10^3 \pm 3,11 \times 10^3$
Control de unión a CD3 hlgG4P-PVA (12) + REGN2810 (100)	$9,29 \times 10^6 \pm 1,82 \times 10^6$
BSMUC16/CD3-001 (12) + REGN2810 (100)	$1,76 \times 10^3 \pm 9,38 \times 10^1$

B. Modelo singénico - ID8-VEGF/huMUC16

Para examinar la eficacia en un modelo inmunocompetente, se reemplazó el gen *CD3* murino por *CD3* humano, y una parte del gen *MUC16* de ratón se reemplazó por la secuencia humana. Los reemplazos produjeron un ratón cuyos linfocitos T expresaban *CD3* humano y que expresaban una molécula *MUC16* quimérica que contenía una parte de *MUC16* humana donde se unen los anticuerpos biespecíficos BSMUC16/CD3-001 y BSMUC16/CD3-005.

Para este primer modelo de tumor singénico, se utilizó la estirpe de células ID8-VEGF genomanipulada para que expresara la parte de *MUC16* humana. A los ratones se les implantaron i.p. células ID8-VEGF/huMUC16 y se trataron con 5 mg/kg de BSMUC16/CD3-001 o control de unión a CD3 con control de isotipo o junto con anti-PD-1 (5 mg/kg i.v.) tres días después de la implantación. El tratamiento con BSMUC16/CD3-001 amplió la mediana de supervivencia en comparación con el grupo que recibió el control de unión a CD3, pero la adición del bloqueo anti-PD-1 también dio como resultado la supervivencia del 50 % de los ratones.

BSMUC16/CD3-001 aumenta significativamente el tiempo medio de supervivencia en un modelo de ascitis ID8-VEGF y la adición del bloqueo de PD-1 (REGN2810) permite la supervivencia de varios ratones. A los ratones que expresaban *CD3* humano en lugar de *CD3* de ratón y una molécula de *MUC16* quimérica se les implantó la estirpe tumoral de ovario murino que expresaba una parte de *MUC16* humana. A los ratones se les administró

BSMUC16/CD3-001 (5 mg/kg i.v.) o se les administró control de unión a CD3 (5 mg/kg i.v.) con control de isotipo o con anti-PD-1 el día 3 después de la implantación. Se trató a los ratones los días 3, 7, 10, 14, 17 después de la implantación del tumor. Los datos mostrados son la mediana de supervivencia. Los ratones se sacrificaron cuando presentaban un aumento de peso superior al 20 % debido a la distensión abdominal inducida por la ascitis. La significación estadística se determinó mediante el método de Mantel-Cox. Tanto el tratamiento con BSMUC16/CD3-001 como con BSMUC16/CD3-001 + anti-PD-1 dieron como resultado un aumento en el tiempo medio de supervivencia y la combinación de BSMUC16/CD3-001 + anti-PD-1 dio como resultado una supervivencia del 50 %, lo que demuestra un efecto sinérgico entre el anticuerpo biespecífico MUC16xCD3 y el anticuerpo anti-PD-1. Los resultados se muestran en la tabla 4, a continuación.

Tabla 4: Supervivencia media en el modelo ID8-VEGF/huMUC16

Anticuerpo (mg/kg)	Mediana de supervivencia (días)
Control de unión a CD3 (5) + control de isotipo (5)	36
BSMUC16/CD3-001 (5) + control de isotipo (5)	46
Control de unión a CD3 (5) + PD-1 (5)	32
BSMUC16/CD3-001 (5) + PD-1 (5)	69,5

Se observaron resultados similares cuando se administró BSMUC16/CD3-001 a 1 mg/kg junto con el anticuerpo anti-PD-1.

C. Modelo singénico - MC38/huMUC16

Como se ha indicado anteriormente, los ratones utilizados en este experimento fueron genomanipulados para que el gen *CD3* murino fuera reemplazado por *CD3* humano y una parte del gen *MUC16* de ratón fuera reemplazado por la secuencia humana. Los reemplazos produjeron un ratón cuyos linfocitos T expresaban CD3 humano y que expresaban una molécula MUC16 quimérica que contenía una parte de MUC16 humana donde se unen el anticuerpo biespecífico BSMUC16/CD3-001 y BSMUC16/CD3-005.

Para este segundo modelo de tumor singénico, se utilizó la estirpe MC38 genomanipulada para que expresara la parte de MUC16 humana. A los ratones se les implantaron s.c. células MC38/huMUC16 y se trataron con BSMUC16/CD3-005 o control de unión a CD3 con control de isotipo (1 mg/kg i.v.) o junto con anti-PD-1 (5 mg/kg i.v.) el día 7 después de la implantación del tumor. El anticuerpo anti-PD-1 utilizado en este experimento fue un anticuerpo murino disponible comercialmente (clon RMP1-14, BioXCell). La combinación de BSMUC16/CD3-005 y anti-PD-1 mostró un efecto antitumoral sinérgico.

La combinación de BSMUC16/CD3-005 y el bloqueo anti-PD-1 dio como resultado una eficacia antitumoral mejor que BSMUC16/CD3-005 solo en un modelo MC38 s.c. A los ratones que expresaban CD3 humano en lugar de CD3 de ratón y una molécula de MUC16 quimérica se les implantó la estirpe tumoral murina MC38 que expresaba una parte de MUC16 humana. A los ratones se les administró BSMUC16/CD3-005 o se les administró control de unión a CD3 (1 mg/kg i.v.) con control de isotipo o con anticuerpo anti-PD-1 (5 mg/kg i.v.) el día 7 después de la implantación. Los ratones se trataron los días 7, 11 y 14 después de la implantación del tumor. Los resultados se ilustran en la figura 2. La significación estadística se determinó mediante ANOVA bilateral con la prueba de comparación múltiple de Tukey. BSMUC16/CD3-005 más anti-PD-1 inhibió de manera significativa y sinérgica el crecimiento tumoral sobre el control de unión a CD3.

Ejemplo 4: Las imágenes de inmuno-PET en ratones genomanipulados mostraron la localización del anticuerpo biespecífico anti-MUC16xCD3 en órganos ricos en linfocitos T

La localización *in vivo* de BSMUC16/CD3-001 y BSMUC16/CD3-005 y la expresión de la proteína MUC16 se evaluaron en ratones de tipo silvestre y genéticamente humanizados mediante imágenes por PET. La biodistribución del anticuerpo anti-MUC16 marcado con ⁸⁹Zr (anticuerpo anti-MUC16 bivalente generado utilizando la misma cadena pesada y ligera anti-MUC16 que los biespecíficos, denominado en el presente documento "parental") fue similar tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones humanizados, lo que sugiere una baja expresión/disponibilidad de la proteína MUC16 humanizada para el anticuerpo. Por el contrario, cuando a los ratones se les administraron dosis terapéuticamente importantes de un anticuerpo biespecífico BSMUC16/CD3-001 marcado con ⁸⁹Zr, la distribución en el bazo y los ganglios linfáticos fue evidente debido al reconocimiento de linfocitos T positivos para CD3 en estos órganos linfoides (datos no mostrados). Los análisis de biodistribución *ex-vivo* en tejidos individuales confirmaron la localización en los ganglios linfáticos y el bazo (datos no mostrados). La captación del anticuerpo biespecífico BSMUC16/CD3-005 marcado con ⁸⁹Zr en tejidos linfoides se redujo considerablemente en relación con BSMUC16/CD3-001 debido a su menor afinidad por CD3. Para evaluar si BSMUC16/CD3-001 y BSMUC16/CD3-005 pueden acumularse en tumores que expresan MUC16, se administraron BSMUC16/CD3-001 marcado con ⁸⁹Zr y BSMUC16/CD3-005 marcado con ⁸⁹Zr a ratones con tumores ID8-VEGF-huMUC16Δ. La captación tumoral entre los anticuerpos biespecíficos no fue significativamente diferente a pesar de la mayor captación linfoide de BSMUC16/CD3-001 (datos no mostrados).

Preparación de inmunoconjugado y PET en animales pequeños: BSMUC16/CD3-001 y el anticuerpo de control se conjugaron con DFO a restos de glutamina en la posición 295 mediante transamidación mediante transglutaminasa microbiana después de la desglucosilación de los anticuerpos con PNGasa F. Después, los anticuerpos conjugados con DFO se quelaron con circonio-89 (⁸⁹Zr). Los ratones recibieron anticuerpos en una dosis final de 0,5 mg/kg mediante inyección en la vena de la cola. A continuación, se realizaron imágenes PET para evaluar la localización *in vivo* del radioinmunoconjugado el día 6 después de la dosificación, antes de estudios de biodistribución *ex-vivo*. Para experimentos en ratones con tumores, a los ratones se les implantó por vía subcutánea 10×10^6 células tumorales ID8-VEGF-huMUC16Δ. A ratones portadores de tumores se les administró anticuerpos radiomarcados con ⁸⁹Zr 20 días después de la implantación cuando los tumores tenían un promedio de 150 mm³.

Se utilizó un instrumento PET/CT Sofie Biosciences G8 precalibrado (Sofie Biosciences (Culver city, CA) y Perkin Elmer) para adquirir imágenes de PET y TC. El intervalo de energía varió entre 150 y 650 keV con una resolución reconstruida de 1,4 mm en el centro del campo de visión. El día 6 después de la dosificación, los ratones se sometieron a anestesia de inducción con isoflurano y se mantuvieron bajo un flujo continuo de isoflurano durante una adquisición de PET estática de 10 minutos. Las imágenes de TC se adquirieron después de la adquisición de PET. Posteriormente, la imagen PET se reconstruyó utilizando ajustes preconfigurados. Los datos de PET y TC con corrección de desintegración se procesaron utilizando el programa informático VivoQuant (inviCRO Imaging Services) en proyecciones de intensidad máxima de PET-TC registradas conjuntamente con colores falsos en una escala de colores calibrada para indicar un intervalo de señal del 0 al 30 % de la dosis inyectada por volumen, expresado como % ID/g. Para análisis de biodistribución *ex-vivo*, los ratones se sacrificaron después de obtener imágenes el día 6 después de la dosificación. La sangre se recogió mediante punción cardíaca en tubos de recuento. Después se extirparon tejidos normales (ganglios linfáticos inguinales y axilares, timo, bazo, corazón, pulmones, estómago, intestino delgado, hígado, riñones, hueso y ovario) y se colocaron en tubos de recuento. Los tumores se recogieron de manera similar en tubos de recuento. Todos los tubos se pesaron previamente y posteriormente se volvieron a pesar para determinar el peso de la sangre y los tejidos. A continuación, se contó la radiactividad de emisión y de todas las muestras en un contador gamma automático (Wizard 2470, Perkin Elmer) y los resultados se indicaron en recuentos por minuto (rpm). El % de ID para cada muestra se determinó utilizando recuentos de muestras en relación con recuentos convencionales de dosis preparados a partir del material inyectado original. Posteriormente, los valores individuales de % de ID/g se obtuvieron dividiendo el valor de % de ID por el peso respectivo de la muestra de sangre, tejido o tumor correspondiente.

BSMUC16/CD3-001 marcado con ⁸⁹Zr y BSMUC16/CD3-005 marcado con ⁸⁹Zr demostraron una localización específica en tumores MUC16+ y tejidos linfoides CD3+, con distribución linfóide que se correlaciona con la afinidad relativa por CD3. Ambos biespecíficos MUC16xCD3 demostraron una localización tumoral equivalente en presencia de tejidos CD3+.

Ejemplo 5: Los estudios de toxicología en macacos cangrejeros no mostraron toxicidad manifiesta para el anticuerpo biespecífico anti-MUC16xCD3

BSMUC16/CD3-001 tiene reacción cruzada con MUC16 y CD3 de mono. Para determinar la seguridad y tolerabilidad y caracterizar la farmacocinética del anticuerpo biespecífico, se realizó un estudio de toxicidad multidosis en macacos cangrejeros. Seis monos/sexo/grupo recibieron administración semanal de BSMUC16/CD3-001 para un total de cinco dosis de 0,01, 0,1 o 1 mg/kg. Al finalizar el período de dosificación, se sacrificaron 3 animales/sexo/grupo y se examinaron los tejidos para detectar hallazgos microscópicos, mientras que los tres animales/sexo/grupo restantes se sometieron a 12 semanas de recuperación sin tratamiento para evaluar la reversibilidad o persistencia de cualquier efecto relacionado con BSMUC16/CD3-001. BSMUC16/CD3-001 fue bien tolerado y todos los animales sobrevivieron hasta el momento de la necropsia programada. El análisis toxicocinético demostró exposiciones proporcionales a la dosis y cinética lineal en todos los grupos de dosis, sin que se observaran diferencias de género (datos no mostrados). Se observó una exposición continua a BSMUC16/CD3-001 durante toda la fase de dosificación, y la exposición a BSMUC16/CD3-001 se mantuvo hasta el final de la fase de recuperación en todos (n = 6) y el 50 % de los animales en las dosis de 0,1 y 1,0 mg/grupos de kg, respectivamente. BSMUC16/CD3-001 no se detectó en el suero de ningún animal en el grupo de 0,01 mg/kg después de la semana 8 de recuperación. La semivida de eliminación de BSMUC16/CD3-001 fue de aproximadamente 10 días.

No hubo observaciones clínicas relacionadas con BSMUC16/CD3-001, ni ningún cambio en los parámetros del análisis de orina, inmunofenotipado de sangre periférica, consumo de alimentos o peso corporal durante los períodos de dosificación o recuperación. De manera destacada, la administración de BSMUC16/CD3-001 no produjo ningún cambio en las evaluaciones farmacológicas de seguridad respiratoria, neurológica o cardiovascular, incluido ningún cambio en los parámetros del ECG. No se encontraron cambios en el peso de los órganos relacionados con BSMUC16/CD3-001, ni se observaron cambios macroscópicos ni en la necropsia terminal ni en la de recuperación. Se observaron elevaciones reversibles relacionadas con la dosis de los marcadores inflamatorios circulantes (proteína C reactiva (PCR) e IL-6) en el plazo de 1 día después de la dosis inicial de 1,0 o 0,1 mg/kg, pero estas elevaciones no fueron evidentes después de dosis posteriores (datos no mostrados). De acuerdo con el aumento mínimo de citocinas en suero, no se detectó la redistribución de linfocitos T después de la administración de BSMUC16/CD3-001 (datos no mostrados), a diferencia de lo que se ha descrito para varias moléculas biespecíficas de CD3 contra tumores hemáticos.

El estudio con macacos cangrejeros se realizó de acuerdo con las directrices de la IACUC. A macacos cangrejeros (6 animales/sexo/grupo) se les administró un artículo de control (placebo diluido) o BSMUC16/CD3-001 (0,01, 0,1 o 1 mg/kg) una vez a la semana mediante una infusión i.v. de 30 minutos. El artículo de control fue histidina 10 mM con sacarosa al 10 % y polisorbato 20 al 0,05 %, pH 6, diluido con cloruro de sodio al 0,9 % para inyección, USP (solución salina estéril). Se recogieron muestras de sangre o tejidos en varios momentos para patología clínica e histopatología. La concentración de BSMUC16/CD3-001 se determinó mediante ELISA y el análisis toxicocinético se realizó con el programa informático WinNonLin. La PCR se analizó en un sistema Roche Modular P 800. Las citocinas se midieron mediante MSD (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Los linfocitos T se cuantificaron mediante citometría de flujo. En resumen, la sangre se recogió en tubos con EDTA de potasio, se lisó, se tiñó para CD3, CD4 y CD8 (BD Biosciences) y los valores relativos para cada fenotipo se determinan utilizando un FACS Canto II. A continuación, estos valores se multiplican por los valores absolutos de linfocitos (mediante análisis hematológico) para enumerar los recuentos absolutos de células para cada fenotipo.

La tinción inmunohistoquímica para MUC16 estuvo presente en los tejidos esperados: páncreas (mesotelio y epitelio ductal), corazón y ovario (datos no mostrados), así como glándula salival (células caliciformes), hígado (mesotelio y conducto biliar), pulmón (mesotelio, epitelio bronquiolar/bronquial), intestino delgado (mesotelio), testículo (mesotelio, red testicular/conducto eferente) y amígdala (epitelio y glándulas mucosas) (no se muestran). Los cambios microscópicos relacionados con BSMUC16/CD3-001, evaluados mediante tinción histológica con hematoxilina y eosina (H&E), incluyeron inflamación (infiltración de glóbulos blancos) y aumento del tamaño y celularidad de las células mesoteliales, lo que provocó un engrosamiento no adverso del revestimiento seroso y/o del tejido conectivo submesotelial de múltiples órganos torácicos y peritoneales. Estos cambios fueron generalmente de naturaleza focal o multifocal y fueron de intensidad mínima a leve y se consideraron específicos para BSMUC16/CD3-001, como resultado de la participación de MUC16 expresada en células epiteliales (mesoteliales) serosas y la activación de linfocitos T. De manera destacada, los cambios serosos se revirtieron o tendieron a revertirse al final del período de recuperación (datos no mostrados).

Los estudios de toxicología en macacos cangrejeros mostraron aumentos mínimos y transitorios en las citocinas séricas y la proteína C reactiva después de la administración de BSMUC16/CD3-001, sin toxicidad manifiesta.

Ejemplo 6: Evaluación de la inducción de citocinas en séricas en ratones portadores de tumores

Debido a que el síndrome de liberación de citocinas (SLC) es un efecto secundario grave y frecuente de los tratamientos con linfocitos T CD3 biespecíficos y CAR, se realizó un estudio para controlar las citocinas séricas en modelos relevantes después del tratamiento con BSMUC16/CD3-001. En ratones MUC16/CD3 genéticamente humanizados y sin tumores, no se evidenció ninguna respuesta de citocinas séricas tras la administración de BSMUC16/CD3-001.

Para evaluar la activación de linfocitos T *in vivo* por BSMUC16/CD3-001, se midieron los niveles de citocinas en suero de ratones con tumores. Se recogieron muestras de suero 4 horas después de la primera dosis de anticuerpo en los grupos de 0,5 mg/kg de BSMUC16/CD3-001, control de unión a CD3 y control de no unión. El tratamiento con linfocitos T activados BSMUC16/CD3-001 según lo determinado por inducción de IFN γ , TNF α , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10, en comparación con el control de no unión y el control de unión a CD3 (datos no mostrados). La respuesta de citocinas inducida por BSMUC16/CD3-001 requirió la presencia tanto de linfocitos T como de células OVCAR-3/Luc, ya que los ratones que portaban sólo células OVCAR3/Luc no tenían IFN γ humano detectable en el suero, y los ratones sin células tumorales para proporcionar MUC16 para el entrecruzamiento no mostraron un aumento en el IFN γ sérico en respuesta a BSMUC16/CD3-001 (datos no mostrados).

Medición de los niveles de citocinas en suero: La activación de linfocitos T en respuesta al tratamiento con BSMUC16/CD3-001 se evaluó mediante la medición de las concentraciones en suero de interferón γ (IFN γ), factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 e IL-1B cuatro horas después de la primera dosis de 0,5 mg/kg. Los niveles de citocinas se analizaron con el kit V-plex Human Proinflammatory-10 Plex siguiendo las instrucciones del fabricante (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MA). Las citocinas se midieron en dos estudios separados con 4 a 6 ratones por grupo.

Ejemplo 7: Expresión de MUC16 en ratones humanizados y efecto de los anticuerpos biespecíficos anti-MUC16xCD3 en tejidos positivos para MUC16

Para investigar la eficacia antitumoral de BSMUC16/CD3-001 en un ratón con un sistema inmunitario completamente inalterado, se genomanipularon ratones para expresar CD3 humano en linfocitos T y una región de MUC16 que cubre la región de unión del anticuerpo, ambas en los loci murinos endógenos (ratones genomanipulados por inserción). Para validar estos ratones, la expresión de MUC16 se examinó mediante RT-PCR e IHC. Se detectó expresión de ARN en la tráquea, así como niveles bajos en el pulmón, corazón, ovario, páncreas y vejiga (datos no mostrados), similar a los datos publicados sobre la expresión de MUC16 murino. Para evaluar la expresión de la proteína MUC16, se realizó una IHC en tejidos seleccionados utilizando un anticuerpo anti-MUC16 humano que reconoce una región proximal a la membrana de MUC16. La expresión de la proteína MUC16 se confirmó en el epitelio superficial del ovario

y el estómago de estos ratones. MUC16 también se observó en el revestimiento/epitelio traqueal, así como en las glándulas submucosas, como se ha descrito en seres humanos (datos no mostrados).

Histología en tejidos de ratón: Se recogieron tejidos de ratones humanizados o TS y se tiñeron con un anticuerpo anti-MUC16 que se une al dominio proximal de membrana de MUC16 mediante IHC utilizando Ventana Discovery XT (Ventana; Tucson, AZ). Se cortaron secciones de parafina de 5 µm en portaobjetos Superfrost PLUS y se hornearon durante una hora a 60 °C. La tinción inmunohistoquímica se realizó en el sistema de tinción IHC automatizado Discovery XT con el kit de detección Ventana DAB Map. La desparafinización se realizó utilizando la solución EZ Prep a 75 °C durante 8 minutos. Se realizó una recuperación leve del antígeno (95 °C, 8 minutos seguidos de 100 °C, 24 minutos) usando tampón Tris-EDTA pH 9 (CC1) de Ventana. A esto le siguieron múltiples etapas de bloqueo. Se incubaron secciones de tejido con el anticuerpo anti-MUC16 (2 µg/ml) durante 8 horas a temperatura ambiente. Se utilizó como control negativo un anticuerpo de control de isotipo que reconoce un anticuerpo no de unión irrelevante. El anticuerpo primario y el control negativo se aplicaron de manera manual. Se utilizó IgG antihumana de cabra biotilada (Jackson ImmunoResearch) como anticuerpo secundario (1 µg/ml) y las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. La señal cromogénica se desarrolló utilizando el kit Ventana DAB MAP. Los portaobjetos se contratiñeron manualmente con hematoxilina (2 minutos), se deshidrataron y se cubrieron con un cubreobjetos. Las imágenes se adquirieron en el escáner de portaobjetos Aperio AT 2 (Leica Biosystems; Buffalo Grove, IL) y se analizaron con el programa informático Indica HALO (Indica Labs; Corrales, NM). La tinción con H&E se realizó mediante Histoserv, Inc (Germantown, MD, EE. UU.).

Los linfocitos T de estos ratones son policlonales, según lo evaluado por el uso de Vβ del receptor de linfocitos T (TCR), expresan CD3 humano y están presentes en cantidades similares a las de los ratones de tipo silvestre (datos no mostrados). Para determinar si BSMUC16/CD3-001 indujo alguna activación de linfocitos T o efectos en los tejidos normales en estos animales, a ratones no portadores de tumores se les inyectó una dosis elevada de BSMUC16/CD3-001 (10 mg/kg) y después se examinaron los números de linfocitos T en sangre, las citocinas séricas y la histopatología. Aunque los linfocitos T pueden activarse por un anticuerpo anti-CD3 humano (OKT3), medido por la marginación de los linfocitos T de la sangre y el aumento de los niveles de citocinas séricas (datos no mostrados), BSMUC16/CD3-001 no indujo dichos efectos, lo que sugiere una accesibilidad limitada a la diana MUC16 (datos no mostrados). Para determinar si BSMUC16/CD3-001 indujo algún cambio microscópico en los tejidos que expresan MUC16, los ratones humanizados MUC16 y CD3 recibieron dos dosis de BSMUC16/CD3-001 a 10 mg/kg el día 0 y el día 3. El día 5, se examinaron varios tejidos que expresan MUC16 (tráquea, estómago y ovario) y no se observó infiltración celular ni necrosis en estos tejidos después de la administración de BSMUC16/CD3-001 (datos no mostrados). El examen histopatológico no reveló inflamación ni infiltración en tejidos que expresan MUC16 en ratones después de la administración de BSMUC16/CD3-001 en el momento examinado.

Los resultados de este estudio, así como del estudio con macacos cangrejeros indicado en el ejemplo 5, demuestran el perfil de seguridad de BSMUC16/CD3-001. BSMUC16/CD3-001 indujo solo citocinas séricas mínimas y, si bien hubo una inducción focal de inflamación y engrosamiento del revestimiento seroso en la expresión de MUC16, lo que sugiere una actividad en la diana, estos efectos se resolvieron al final del período de recuperación y fueron coherentes con la inflamación y el aumento de la celularidad indicativos de reparación. Los cambios serosos observados no se correlacionaron con ninguna observación clínica, patología clínica (excepto respuesta inflamatoria) o cambios microscópicos en el parénquima subyacente. Por tanto, los estudios tanto en ratones genéticamente humanizados como en macacos cangrejeros muestran que BSMUC16/CD3-001 fue bien tolerado.

Ejemplo 8: Control de la expresión de PD-1 en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS utilizando células efectoras humanas indiferenciadas

Para controlar la destrucción específica de células diana que portan Muc16 mediante citometría de flujo, la línea celular de ovario OVCAR-3 se marcó con 1 µM de Violet CellTracker. Después del marcaje, las células se sembraron en placas durante la noche a 37 °C. Por separado, las PBMC humanas se sembraron en placas en medio RPMI complementado a 1×10^6 células/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para enriquecer los linfocitos mediante el agotamiento de macrófagos adherentes, células dendríticas y algunos monocitos. Al día siguiente, las células diana se incubaron conjuntamente con PBMC indiferenciadas empobrecidas en células adherentes (células efectoras/diana 4:1) y una dilución en serie de BSMUC16/CD3-001 o el control de unión a CD3 durante 72 horas a 37 °C. Las células se eliminaron de las placas de cultivo celular mediante tripsina y se analizaron mediante FACS. Para el análisis por FACS, las células se tiñeron con un rastreador de glóbulos rojos muertos/vivos (Invitrogen). Para la evaluación de la especificidad de destrucción, las células se seleccionaron en poblaciones marcadas con Violet CellTracker.

La expresión de PD-1 se evaluó incubando células con anticuerpos directamente conjugados contra CD2, CD4, CD8 y PD-1 informando el porcentaje de linfocitos T positivos para PD-1/CD4 o linfocitos T positivos para PD-1/CD8 del total de linfocitos T (CD2+). La incubación con BSMUC16/CD3-001 aumentó el porcentaje de linfocitos T PD-1+ en más de 10 veces (linfocitos T CD4+) o más de 3 veces (linfocitos T CD8+) en comparación con los controles. Los resultados se muestran en la figura 3.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a muerte programada 1 (PD-1) para su uso en un método para tratar o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa MUC16 junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a MUC16 y un segundo brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a CD3, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a PD-1 y el anticuerpo biespecífico, en donde:
- (a) el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, HCDR1, HCDR2, HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 y 40, respectivamente;
 - (b) el primer brazo de unión a antígeno (A) del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, A-HCDR1, A-HCDR2 y A-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3, en donde A-HCDR1, A-HCDR2, A-HCDR3, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente; y
 - (c) el segundo brazo de unión a antígeno (B) del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, B-HCDR1, B-HCDR2 y B-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3, en donde B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 y 13, respectivamente, o de las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 y 13, respectivamente.
2. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a MUC16 y un segundo brazo de unión a antígeno que se une de manera específica a CD3 para su uso en un método para tratar o inhibir el crecimiento de un tumor que expresa MUC16 junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a muerte programada 1 (PD-1), comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesita el anticuerpo biespecífico y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a PD-1, en donde:
- (a) el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, HCDR1, HCDR2, HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39 y 40, respectivamente;
 - (b) el primer brazo de unión a antígeno (A) del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, A-HCDR1, A-HCDR2 y A-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3, en donde A-HCDR1, A-HCDR2, A-HCDR3, A-LCDR1, A-LCDR2 y A-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respectivamente; y
 - (c) el segundo brazo de unión a antígeno (B) del anticuerpo biespecífico comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada, B-HCDR1, B-HCDR2 y B-HCDR3, y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3, en donde B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 y 13, respectivamente, o de las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 y 13, respectivamente.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde una o más dosis del anticuerpo anti-PD-1 se administran junto con una o más dosis del anticuerpo biespecífico.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3:
- (a) el anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto, opcionalmente en donde cada dosis del anticuerpo anti-PD-1 comprende entre 10 y 8000 microgramos;
 - (b) el anticuerpo biespecífico se administra a una dosis de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto, opcionalmente en donde cada dosis del anticuerpo biespecífico comprende entre 10 y 8000 microgramos;
 - (c) cada dosis del anticuerpo anti-PD-1 se administra de 0,5 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior;
 - (d) cada dosis del anticuerpo biespecífico se administra de 0,5 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior; y/o
 - (e) los anticuerpos se administran por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde:

- 5 (a) el tumor comprende un cáncer de ovario o el tumor comprende un cáncer de páncreas; y/o
- (b) el sujeto es resistente o responde de manera inadecuada a un tratamiento previo, o recae tras él.

6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método comprende además administrar al sujeto un tercer agente terapéutico o tratamiento, opcionalmente, en donde el tercer agente terapéutico o tratamiento se selecciona del grupo que consiste en radiación, cirugía, un agente quimioterápico, una vacuna contra el cáncer, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un inhibidor de la angiopoyetina-2 (Ang2), un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un anticuerpo contra un antígeno específico de tumores, vacuna contra el bacilo de Calmette-Guerin, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, una citotoxina, un inhibidor del receptor de interleucina 6 (IL-6R), un inhibidor del receptor de interleucina 4 (IL-4R), un inhibidor de la IL-10, IL-2, IL-7, IL-21, IL-15, un conjugado de anticuerpo y fármaco, un medicamento antiinflamatorio y un suplemento dietético.

7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el primer brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3 del segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 11, 12 y 13, respectivamente.

9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde B-HCDR1, B-HCDR2, B-HCDR3, B-LCDR1, B-LCDR2 y B-LCDR3 del segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 11, 12 y 13, respectivamente.

11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el segundo brazo de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico comprende un HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 12, en donde el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 10 a 12, en donde el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 emparejada con una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o el anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que

ES 2 984 972 T3

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

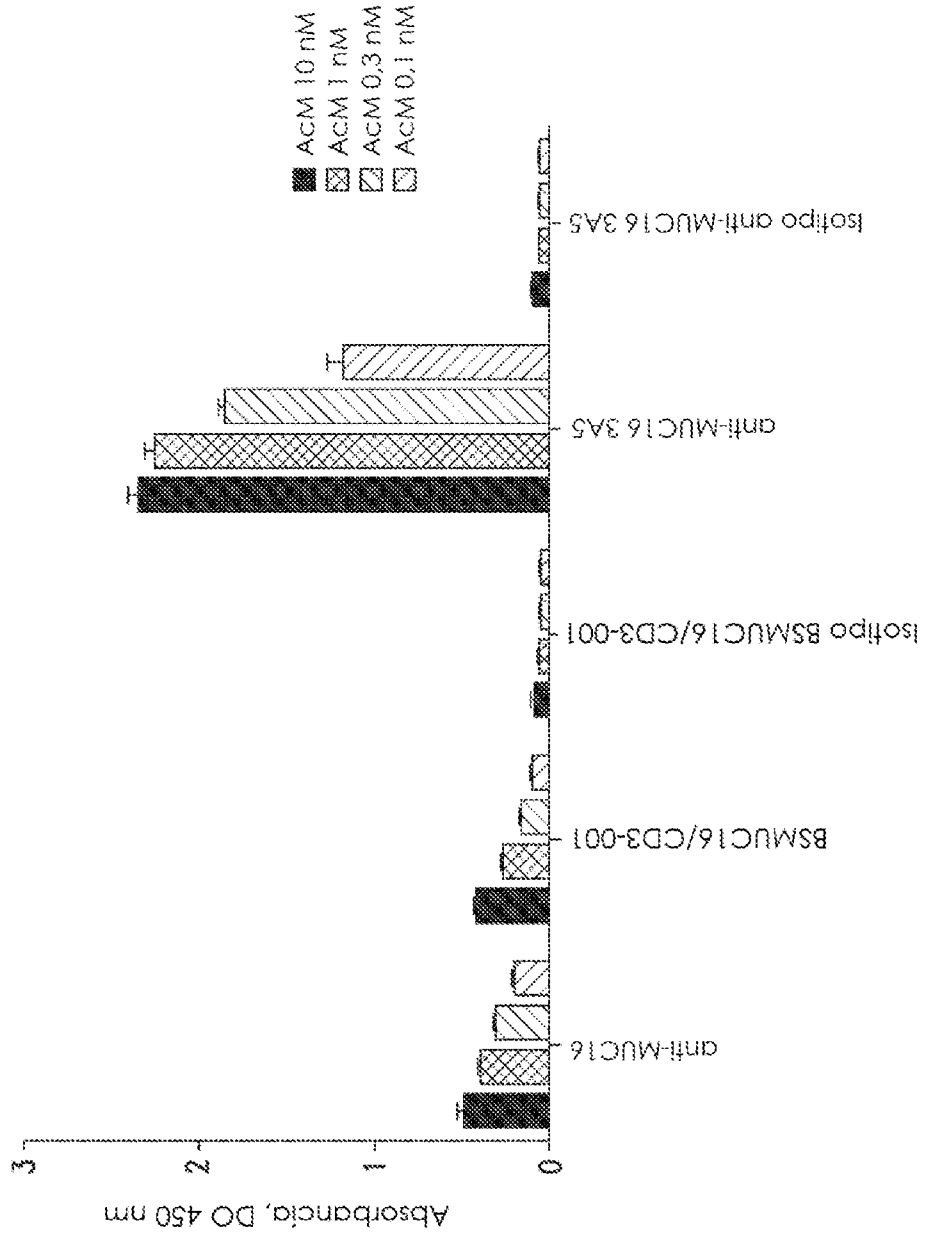


FIG.1

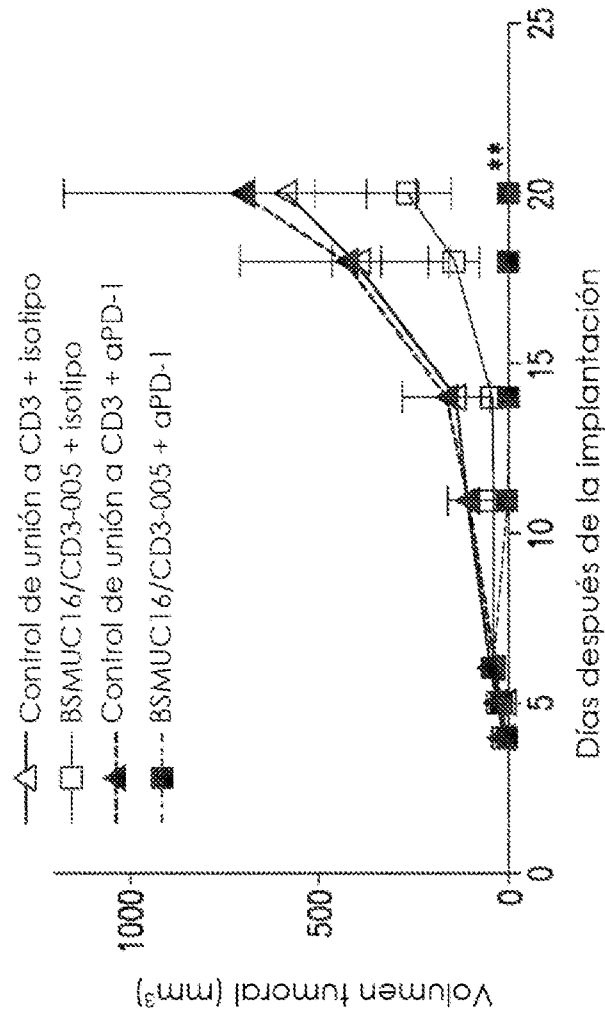


FIG.2

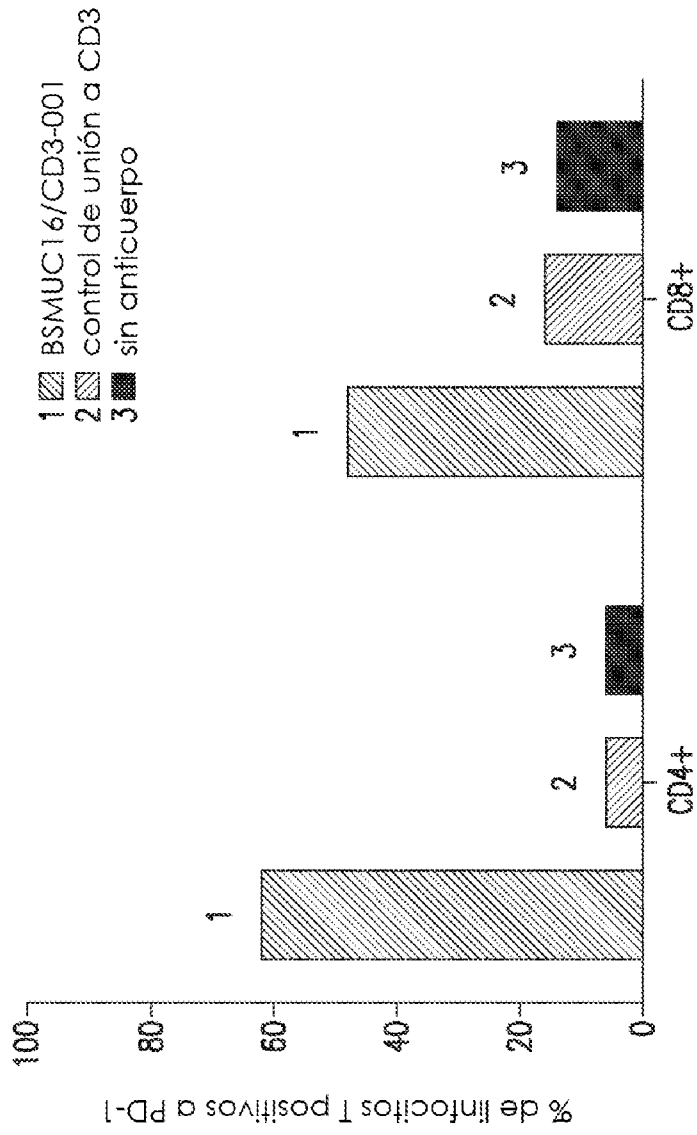


FIG.3