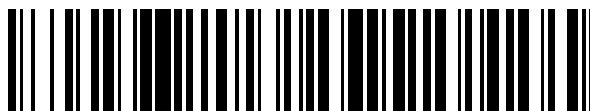


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: &\* \* + ' ( &\$

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: \$) '\$&"&\$% D7 H#D&\$% #) &% \$

87 Fecha y número de publicación internacional: %\$ '\$, "&\$% K C %\$ %&%(

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: \$) '\$&"&\$% 9`% +\$) ' \$( 'f) L

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: &\$`%&"&\$%+ 9D`&- ) ' - +{(

54 Título: 5 b h j w Y f d c g V j Y g d Y w z V c g V c b h U 7 8 " " " m i V w a U

30 Prioridad:

\$) '\$&"&\$% '9D`% \$\$\$) +\$  
\$) '\$&"&\$% '9D`% \$\$\$) +%

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

%\$ '\$) "&\$%,

73 Titular/es:

9B; A56`GAF @f/\$'\$ \$i L  
fci H`XY'DYffYi I`%  
&\$%+`6ci XfnZ7 <

72 Inventor/es:

Jl Z A-B<`8-9 A/  
GHF9-BZ? @I G/  
AC9GGB9FZ9??9<5F8/  
<CG9ZF5 @/  
5GHZC @J9F/  
: F9-ACG9F!; FI B8G7<C69FZ5BB9/  
65757ZA5F-B5/  
: 5I H-ZH5B>5/  
? @-BZ7<F-GH5B/  
I A5B5ZD56 @C`m  
ACG9FZG5AI 9 @

74 Agente/Representante:

G5 @5` : 9FF9FZ>cUb

### Observaciones :

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

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).

9G`&\* \* + ' ( &\$`H

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos contra CD3ε y bcma

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos contra CD3ε y BCMA, su fabricación y uso.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** Blanco de maduración de células B humanas, también conocido como BCMA; TR17\_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), es un miembro de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral que se expresa preferentemente en células plasmáticas diferenciadas [Laabi et al. 1992; Madry et al. 1998]. BCMA es una proteína transmembrana tipo III no glicosilada, que participa en la maduración, el crecimiento y la supervivencia de las células B. BCMA es un receptor para dos ligandos de la superfamilia TNF: APRIL (un ligando inductor de proliferación), el  
 15 ligando de alta afinidad para BCMA y el factor de activación de células B BAFF, el ligando de baja afinidad para BCMA (THANK, BlyS, estimulador de linfocitos B, TALL-1 y zTNF4). APRIL y BAFF muestran similitud estructural y especificidad de unión al receptor al que se unen, pero distintas. El regulador negativo TACI también se une a BAFF y APRIL. La unión coordinada de APRIL y BAFF a BCMA y/o TACI activa el factor de transcripción NF-κB y aumenta la expresión de los miembros de la familia pro-supervivencia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) y la  
 20 regulación a la baja de los factores pro-apoptóticos (por ejemplo, Bid, Bad, Bik, Bim, etc.), lo que inhibe la apoptosis y promueve la supervivencia. Esta acción combinada promueve la diferenciación, proliferación, supervivencia y producción de anticuerpos de las células B (como se revisó en Rickert RC y col., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133). Los anticuerpos contra BCMA se describen, p. ej. en Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106, WO200124811 y WO200124812. El uso de anticuerpos anti-BCMA para el tratamiento de linfomas y mieloma  
 25 múltiple se menciona, p. ej. en los documentos WO2002066516 y WO2010104949.

- [0003]** El complejo TCR/CD3 de linfocitos T consiste en un heterodímero TCR alfa (α)/beta (β) o TCR gamma (γ)/delta (δ) coexpresado en la superficie celular con las subunidades invariables de CD3 marcadas gamma (γ), delta (δ), épsilon (ε), zeta (ζ) y eta (η). El CD3ε humano se describe en UniProt P07766 (CD3E\_HUMAN). Un anticuerpo  
 30 anti CD3ε descrito en la técnica más reciente es SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137: 1097-1100). SP34 reacciona con CD3 de primate y humano. SP34 está disponible en Pharmingen. Otro anticuerpo anti CD3 descrito en la técnica más reciente es UCHT-1 (véase el documento WO2000041474). Otro anticuerpo anti CD3 descrito en la técnica más reciente es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute, usado en los ensayos de Fase I/II de GvHD, Anasetti y col., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34 difiere de UCHT-1 y BC-3 en que SP34  
 35 reconoce un epítipo presente únicamente en la cadena ε de CD3 (véase Salmeron y col., (1991) J. Immunol. 147: 3047) mientras que UCHT-1 y BC-3 reconocen un epítipo aportado por las cadenas ε y γ. La secuencia de un anticuerpo con la misma secuencia que el anticuerpo SP34 se menciona en WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 y WO2010037838. En el documento US 8236308 (WO2007042261) se menciona una secuencia que es idéntica en un 96 % a VH del anticuerpo SP34. Las  
 40 secuencias VH y VL de un anticuerpo adicional con las mismas secuencias que SP34 se muestran en SEQ ID NO:7 y 8.

- [0004]** Se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes en el pasado reciente, p. ej. por fusión de, p. ej. un formato de anticuerpo IgG y dominios monocatenarios (véase  
 45 Kontermann RE, mAbs 4: 2, (2012) 1-16). Los anticuerpos biespecíficos en los que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí se describen en los documentos WO2009080251 y WO2009080252.

- [0005]** Un procedimiento para eludir el problema de subproductos erróneos, que se conoce como "knobs-into-holes", tiene como objetivo forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes mediante la  
 50 introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena, los aminoácidos voluminosos fueron reemplazados por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "agujero". Por el contrario, los aminoácidos con cadenas laterales grandes se introdujeron en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Al coexpresar estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que deben ser  
 55 apropiadas para ambas cadenas pesadas), altos rendimientos de formación de heterodímeros ("agujero-botón") frente a la formación de homodímeros ("agujero-agujero" o "botón-botón") se observaron (Ridgway JB, Presta LG, Carter P y WO1996027011). El porcentaje de heterodímero podría aumentarse adicionalmente mediante la remodelación de las superficies de interacción de los dos dominios CH3 usando un procedimiento de presentación en fagos y la introducción de un puente disulfuro para estabilizar los heterodímeros (Merchant AM, et al, Nature

Biotech 16 (1998) 677-681; Atagewell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26 - 35). Los nuevos procedimientos para la tecnología de knobs-into-holes se describen en, p. ej. en el documento EP 1870459A1. Aunque este formato parece muy atractivo, actualmente no hay datos que describan la progresión hacia la clínica. Una limitación importante de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos originales deben ser  
 5 idénticas para evitar el emparejamiento incorrecto y la formación de moléculas inactivas. Por lo tanto, esta técnica no es apropiada para desarrollar fácilmente anticuerpos biespecíficos recombinantes contra dos dianas a partir de dos anticuerpos contra el primer y el segundo blanco, ya que las cadenas pesadas de estos anticuerpos y/o las cadenas ligeras idénticas deben optimizarse. Xie, Z., y col., J Immunol Methods 286 (2005) 95-101 se refiere a un formato de anticuerpo biespecífico que usa scFvs en combinación con tecnología de knobs-into-holes para la parte FC. WO  
 10 2012116927 y WO 2010/145792, mencionan el intercambio de los dominios CH1 y CL. El documento WO 2009/080254 menciona construcciones de knobs-into-holes para producir anticuerpos biespecíficos.

**[0006]** Los anticuerpos contra BCMA se describen, p. ej. en Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106, WO200124811, WO200124812, WO2010104949 y WO2012163805. Los anticuerpos contra BCMA y su uso  
 15 para el tratamiento de linfomas y mieloma múltiple se mencionan, p. ej. en los documentos WO2002066516 y WO2010104949. El documento WO2013154760 se refiere a receptores de antígenos quiméricos que comprenden una región de reconocimiento de BCMA y una región de activación de células T.

**[0007]** Ryan, MC y col., Mol. Cáncer Ther. 6 (2007) 3009-3018 relacionan la fijación selectiva de BCMA con  
 20 las neoplasias de células plasmáticas. El anticuerpo SG1, con actividad de bloqueo del ligando, podría promover la citotoxicidad de líneas celulares de mieloma múltiple (MM) como anticuerpos desnudos o como conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). SG1, un anticuerpo BCMA inhibidor, bloquea la activación dependiente de APRIL del factor nuclear- $\kappa$ B de una manera dependiente de la dosis in vitro. La citotoxicidad de SG1 se evaluó como un anticuerpo desnudo después de la quimerización con y sin mutaciones de Fc que potencian la unión de Fc $\gamma$ RIIIA.  
 25 Ryan también menciona el anticuerpo SG2 que no inhibe significativamente la unión de APRIL a BCMA. Sin embargo, SG2 mostró un valor IC<sub>50</sub> 20 veces mayor que el SG1 medido como actividad citotóxica de un fármaco conjugado contra líneas celulares de mieloma positivas para BCMA. Ryan concluye que los anticuerpos BCMA pueden actuar sobre líneas celulares MM a través de múltiples mecanismos que incluyen la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de APRIL, la promoción de la lisis de células tumorales por actividad ADCC  
 30 mediada por células asesinas naturales y la inducción de citotoxicidad por ADCs.

**[0008]** Los anticuerpos biespecíficos contra CD3 y BCMA se mencionan en los documentos WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058 y WO2012143498.

## 35 RESUMEN DE LA INVENCION

**[0009]** Basándose en la descripción aquí contenida, la presente invención describe un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD $\epsilon$  humano y al antígeno de maduración de células B humanas (BCMA), en donde el anticuerpo biespecífico comprende:

- 40 (a) un primer fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a BCMA (primer fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA);  
 (b) un segundo fragmento Fab del anticuerpo que se une específicamente a BCMA (segundo fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA);  
 45 (c) una parte Fc; y  
 (d) un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a CD3 $\epsilon$  (fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$ ), en el que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 del fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  son reemplazados el uno por el otro,  
 50 en el que el primer fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA se une a través de su extremo C al extremo N de la región bisagra de la parte Fc, el fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  está unido a través de su extremo C-terminal al extremo N de la región bisagra de la parte Fc, y el segundo fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA se une químicamente a través de su extremo C al extremo N del fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$ .

55 **[0010]** En un aspecto adicional, la presente invención describe una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0011]** En un aspecto adicional, la presente invención describe el anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica de la invención para usar como un medicamento.

**[0012]** En otro aspecto más, la presente invención describe el anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica de la invención para usar como un medicamento en el tratamiento de trastornos de células plasmáticas.

**[0013]** La presente invención y las realizaciones de esta se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

**[0014]** La invención comprende un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos dianas CD3ε humanos (denominados adicionalmente también "CD3") y el dominio extracelular de BCMA humano (denominado también "BCMA"), caracterizado porque la unión de dicho anticuerpo en una concentración de 6,25 nM no se reduce en 140 ng/ml de APRIL murino durante más de 10 %, preferiblemente no se reduce en más de 1 % medido en un ensayo ELISA como OD a 450 nm en comparación con la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano sin APRIL. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico se caracteriza porque la unión de dicho anticuerpo en una concentración de 50 nM no se reduce en 140 ng/ml de APRIL murino por más del 10 %, medida en un ensayo ELISA como OD a 450 nm, en comparación con la unión de dicho anticuerpo para BCMA humano sin APRIL.

**[0015]** Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque muestra un valor de EC50 para la unión de anticuerpos anti-BCMA a células H929 (ATCC® CRL-9068™) de 15 nM o menos.

**[0016]** La descripción se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3 humano (denominado también "CD3") y al dominio extracelular de BCMA humano (denominado también "BCMA"), caracterizado porque

- i) dicho anticuerpo biespecífico es una proteína de fusión de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 unido químicamente en su extremo N al extremo C de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-BCMA y
- ii) los dominios variables VL y VH del anticuerpo anti-CD3 o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

**[0017]** Preferiblemente, un dominio VH de dicho anticuerpo anti-CD3 está unido a un dominio CH1 o CL de dicho anticuerpo anti-BCMA.

**[0018]** Preferiblemente, un dominio VL de dicho anticuerpo anti-CD3 está unido a un dominio CH1 o CL de dicho anticuerpo anti-BCMA. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico comprende no más de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3, no más de dos fragmentos Fab de un anticuerpo anti-BCMA y no más de una parte Fc, preferiblemente una parte Fc humana. Preferiblemente, no más de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 y no más de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-BCMA están unidos a la parte Fc y el enlace se realiza a través de la unión C-terminal del fragmento(s) Fab a la región bisagra. Preferiblemente, el segundo fragmento Fab de un anticuerpo anti-BCMA se une a través de su extremo C al extremo N del fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 o a la región bisagra de la parte Fc. Los anticuerpos biespecíficos preferidos se muestran en la Figura 3.

**[0019]** Especialmente preferidos son estos anticuerpos biespecíficos que comprenden solo los fragmentos Fab y la parte Fc como se especifica:

Fab BCMA-Fc-Fab CD3-Fab BCMA (formato biespecífico 3.1)

Fc-Fab CD3-Fab BCMA (formato biespecífico 3.2),

Fab CD3-Fab BCMA (formato biespecífico 3.3),

Fab CD3-Fab BCMA-Fab BCMA (formato biespecífico 3.4),

**[0020]** Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo fragmento Fab de dicho anticuerpo anti-BCMA unido químicamente con su extremo C al extremo N-terminal del primer fragmento Fab de dicho anticuerpo anti-BCMA. Preferiblemente, un dominio VH de dicho primer anticuerpo anti BCMA está unido a un dominio CH1 o CL de dicho segundo anticuerpo anti-BCMA. Preferiblemente, un dominio VL de dicho primer anticuerpo anti-BCMA está unido a un dominio CH1 o CL de dicho segundo anticuerpo anti-BCMA.

**[0021]** Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico comprende una parte Fc unida con su extremo N al extremo C de dicho anticuerpo anti-CD3. Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico comprende una parte Fc unida con su primer extremo N al extremo C de dicho anticuerpo anti-CD3 y un segundo fragmento Fab de dicho anticuerpo anti-BCMA unido con su extremo C al segundo extremo N-terminal de la parte Fc. Preferiblemente, el dominio CL del fragmento Fab del anticuerpo CD3 está unido a la región bisagra de la parte Fc. Preferiblemente, el

dominio CH1 del fragmento Fab del anticuerpo BCMA está unido a la región bisagra de la parte Fc.

**[0022]** Los fragmentos Fab se unen químicamente entre sí mediante el uso de un enlazador apropiado de acuerdo con la técnica más avanzada. Preferiblemente se usa un enlazador (Gly<sub>4</sub>-Ser<sub>1</sub>)<sub>3</sub> (Desplancq DK y col., Protein Eng. 1994 Aug; 7 (8): 1027-33 y Mack M. y col., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025).

**[0023]** Los anticuerpos de acuerdo con la invención mencionados anteriormente se caracterizan preferiblemente por las características mencionadas a continuación, especialmente con respecto a que la unión de dicho anticuerpo no se reduce en 100 ng/ml de APRIL y preferiblemente por BAFF en más del 20 % y no alteran la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más del 20 %, con y sin APRIL y preferiblemente con y sin BAFF en más del 20 %.

**[0024]** La descripción se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3ε humano (también denominado "CD3") y al dominio extracelular de BCMA humano (denominado también "BCMA"), caracterizado porque

- a) comprende la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a uno de dichos objetivos; y
- b) comprende la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al otro de dichos objetivos, donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí, y se caracterizan porque
- c) la unión de dicho anticuerpo que se une específicamente a BCMA humano no se reduce en 100 ng/ml de APRIL en más del 20 % medido en un ensayo ELISA como OD a 405 nm en comparación con la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano sin APRIL,
- d) dicho anticuerpo no altera la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más del 20 %, en comparación con APRIL solo, y
- e) dicho anticuerpo no altera la activación de NF-κB sin APRIL en más del 20 %, en comparación con dicho anticuerpo.

**[0025]** El anticuerpo desnudo que se une específicamente a BCMA del que se deriva la porción de anticuerpo anti-BCMA del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención también muestra las características de c) a e) mencionadas anteriormente.

**[0026]** Preferiblemente, el anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque la unión de dicho anticuerpo al BCMA humano no se reduce en 100 ng/ml de APRIL en más de 15 %, medida en dicho ELISA. Preferiblemente, el anticuerpo se caracteriza además porque la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano no se reduce en 1000 ng/ml de APRIL y no se reduce en 1000 ng/ml, en más de 20 %, medida en dicho ELISA. Preferiblemente, el anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano no se reduce en 1000 ng/ml de APRIL en más de 15 %, medida en dicho ELISA.

**[0027]** Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más del 15 %. Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF-κB sin APRIL en más del 15 %.

**[0028]** La descripción se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a las dos dianas CD3ε humano (también denominado "CD3") y al dominio extracelular de BCMA humano (denominado también "BCMA"), caracterizado porque

- a) comprende la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a uno de dichos objetivos; y
- b) comprende la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al otro de dichos objetivos, donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí, y se caracterizan porque
- c) la unión de dicho anticuerpo que se une específicamente a BCMA humano no se reduce en 100 ng/ml de APRIL y no se reduce en 100 ng/ml de BAFF en más de 20 % medida en un ensayo ELISA como OD a 405 nm en comparación con la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano sin APRIL o BAFF respectivamente,
- d) dicho anticuerpo no altera la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más de 20 %, en comparación con APRIL solo,
- e) dicho anticuerpo no altera la activación de NF-κB dependiente de BAFF en más de 20 %, en comparación con

BAFF solo, y

f) dicho anticuerpo no altera la activación de NF- $\kappa$ B sin BAFF y APRIL en más de 20 %, en comparación con dicho anticuerpo.

- 5 **[0029]** El anticuerpo desnudo que se une específicamente a BCMA del que se deriva la porción de anticuerpo anti-BCMA del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención también muestra las características c) a f) mencionadas anteriormente.

10 **[0030]** Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano se caracteriza porque comprende un VH de dominio variable que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y un VL de dominio variable que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 respectivamente como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo anti CD3 $\epsilon$  (CDR MAB CD3). Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a CD3 humano se caracteriza porque los dominios variables son de SEQ ID NO: 7 y 8 (VHVL MAB CD3).

15 **[0031]** Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de dominio variable que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 37 a 45, 47 a 55 y 57 a 65 como respectivamente las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y una VL de dominio variable que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 67 a 75, 77 a 85 y 87 a 95 respectivamente como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo anti BCMA. Preferiblemente, la porción de anticuerpo que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque el dominio variable VH se selecciona del grupo de SEC ID N°: 17 a 25 y el dominio variable VL se selecciona del grupo de SEC ID N°: 27 a 35, respectivamente.

25 **[0032]** Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano, se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEQ ID NO: 37, una CDR2H de SEQ ID NO: 47, una CDR3H de SEQ ID NO: 57 y una CDR1L de SEQ ID NO: 67, una CDR2L de SEQ ID NO: 77, una CDR3L de SEQ ID NO: 87 (CDR MAB 13C2). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEQ ID NO: 38, una CDR2H de SEQ ID NO: 48, una CDR3H de SEQ ID NO: 58 y una CDR1L de SEQ ID NO: 68, una CDR2L de SEQ ID NO: 78, una CDR3L de SEQ ID NO: 88 (CDR MAB 17A5). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano, se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEQ ID NO: 39, una CDR2H de SEQ ID NO: 49, una CDR3H de SEQ ID NO: 59 y una CDR1L de SEQ ID NO: 69, una CDR2L de SEQ ID NO: 79, una CDR3L de SEQ ID NO: 89 (CDR MAB 83A10). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEQ ID NO: 40, una CDR2H de SEQ ID NO: 50, una CDR3H de SEQ ID NO: 60 y una CDR1L de SEQ ID NO: 70, una CDR2L de SEQ ID NO: 80, una CDR3L de SEQ ID NO: 90 (CDR MAB 13A4). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEQ ID NO: 41, una CDR2H de SEQ ID NO: 51, una CDR3H de SEQ ID NO: 61 y una CDR1L de SEQ ID NO: 71, una CDR2L de SEQ ID NO: 81, una CDR3L de SEQ ID NO: 91 (CDR MAB 13D2). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza por comprender una CDR1H de SEQ ID NO: 42, una CDR2H de SEQ ID NO: 52, una CDR3H de SEQ ID NO: 62 y una CDR1L de SEQ ID NO: 72, una CDR2L de SEQ ID NO: 82, una CDR3L de SEQ ID NO: 92 (CDR MAB 14B11). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEQ ID NO: 43, una CDR2H de SEQ ID NO: 53, una CDR3H de SEQ ID NO: 63 y una CDR1L de SEQ ID NO: 73, una CDR2L de SEQ ID NO: 83, una CDR3L de SEQ ID NO: 93 (CDR MAB 14E1). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza por comprender una CDR1H de SEQ ID NO: 44, una CDR2H de SEQ ID NO: 54, una CDR3H de SEQ ID NO: 64 y una CDR1L de SEQ ID NO: 74, una CDR2L de SEQ ID NO: 84, una CDR3L de SEQ ID NO: 94 (CDR MAB29B11). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEQ ID NO: 45, una CDR2H de SEQ ID NO: 55, una CDR3H de SEQ ID NO: 65 y una CDR1L de SEQ ID NO: 75, una CDR2L de SEQ ID NO: 85, una CDR3L de SEQ ID NO: 95 (CDR MAB29F3).

55 **[0033]** Una realización adicional de la invención se caracteriza porque el anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3 $\epsilon$  y BCMA consiste en CDR MAB CD3 y un CDR MAB, seleccionado del grupo que consiste en 13C2, 17A5, 83A10, 13A4, 13D2, 14B11, 14E1, 29B11 y 29F3 del formato biespecífico 3.1.

**[0034]** Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende un VH seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 a 25 y/o que comprende un VL seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 a 35.

5 **[0035]** Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 17 y una VL de SEQ ID NO: 27 (VHVL MAB 13C2). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 18 y una VL de SEQ ID NO: 28 (VHVL MAB 17A5). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une  
10 específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 19 y una VL de SEQ ID NO: 29 (VHVL MAB 83A10). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 20 y una VL de SEQ ID NO: 30 (VHVL MAB 13A4). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 21 y una VL de  
15 SEQ ID NO: 31 (VHVL MAB 13D2). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 22 y una VL de SEQ ID NO: 32 (VHVL MAB 14B11). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 23 y una VL de SEQ ID NO: 33 (VHVL MAB 14E1). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 24 y una VL de SEQ ID NO: 34 (VHVL MAB 29B11). Preferiblemente, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 25 y una VL de SEQ ID NO: 35 (VHVL MAB 29F3).

25 **[0036]** En una realización adicional de la invención, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se caracteriza porque comprende una CDR1H de SEC ID NO: 46, una CDR2H de SEC ID NO: 56, una CDR3H de SEQ ID NO: 66 y una CDR1L de SEQ ID NO: 76, una CDR2L de SEQ ID NO: 86, una CDR3L de SEQ ID NO: 96 (CDR MAB 13A7). En una realización adicional de la invención, la porción de anticuerpo, preferiblemente el fragmento Fab, que se une específicamente a BCMA humano se  
30 caracteriza porque comprende una VH de SEQ ID NO: 26 y una VL de SEQ ID NO: 36 (VHVL MAB 13A7). La unión del anticuerpo MAB 13A7 se reduce en 100 ng/ml de APRIL durante más del 20 % medido en un ensayo ELISA.

**[0037]** Una realización adicional de la invención se caracteriza porque el anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3ε y BCMA consiste en VHVL MAB CD3 y un VHVL MAB, seleccionado del grupo que consiste  
35 en 13C2, 17A5, 83A10, 13A4, 13D2, 14B11, 14E1, 29B11 y 29F3 del formato biespecífico 3.1.

**[0038]** Preferiblemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se caracteriza porque el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se encuentran en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios de anticuerpo CH3; en el que dicha interfaz está alterada para  
40 promover la formación del anticuerpo biespecífico, en el que la alteración se caracteriza porque:

a) el dominio CH3 de una cadena pesada está alterado, de modo que dentro de la interfaz original el dominio CH3 de una cadena pesada que cumple con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico, se reemplaza un residuo de aminoácido con todo residuo de aminoácido que tenga un  
45 volumen de cadena lateral mayor, generando así una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que se puede colocar en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada y

b) el dominio CH3 de la otra cadena pesada está alterado, de modo que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se encuentra con la interfaz original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico se  
50 reemplaza un residuo aminoácido con un residuo aminoácido que tenga un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de ese modo una cavidad dentro de la interfaz del segundo dominio CH3 dentro del cual es posible una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

**[0039]** Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor se selecciona del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V). Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque ambos dominios CH3 se alteran adicionalmente mediante la introducción de cisteína

(C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3. Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque uno de los dominios de cadena pesada constante CH3 de ambas cadenas pesadas se reemplaza por un dominio de cadena pesada constante CHI; y el otro dominio CH3 de cadena pesada constante se reemplaza por un dominio CL de cadena ligera constante.

5 **[0040]** Preferiblemente, el anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano no se reduce en 100 ng/ml de APRIL y no se reduce en 100 ng/ml de BAFF en más de 15 %, medida en dicho ELISA. Preferiblemente, el anticuerpo se caracteriza además porque la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano no se reduce en 1000 ng/ml de APRIL y no se reduce en 1000 ng/ml, en más de 20 %, medida en dicho  
10 ELISA. Preferiblemente, el anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque la unión de dicho anticuerpo a BCMA humano no se reduce en 1000 ng/ml, APRIL y no se reduce en 1000 ng/ml de BAFF en más de 15 %, medida en dicho ELISA.

**[0041]** Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF-κB  
15 dependiente de APRIL en más del 15 %. Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF-κB dependiente de BAFF en más de 15 %. Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF-κB sin APRIL y BAFF en más de 15 %.

**[0042]** Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque su unión a BCMA no  
20 se reduce por APRIL y preferiblemente no se reduce por BAFF en más de 25 %, preferiblemente no más de 20 %, preferiblemente no más de 10 %, medido como unión de dicho anticuerpo en una concentración de 140 nM, preferiblemente 50 nM, y preferiblemente 5 nM a células NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) en presencia o ausencia de APRIL o BAFF respectivamente en una concentración de 2,5 mg/ml en comparación con la unión de dicho anticuerpo a células NCI-H929 sin APRIL o BAFF, respectivamente.

25 **[0043]** Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza adicionalmente porque se une también específicamente a BCMA de macaco.

**[0044]** Un ejemplo de la descripción es un procedimiento para la preparación de un anticuerpo biespecífico  
30 de acuerdo con la invención que comprende los pasos de

- a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y pesada de un anticuerpo que se une específicamente al primer objetivo y vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y pesada de un anticuerpo que se une específicamente al  
35 segundo objetivo, en el que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí;
- b) cultivar la célula huésped en condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
- c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

40 **[0045]** Un ejemplo adicional de la descripción es una célula hospedadora que comprende vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al primer objetivo y vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente al segundo objetivo, donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CHI se reemplazan entre sí.

45 **[0046]** Una realización preferida adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0047]** Un ejemplo adicional de la descripción es una composición de diagnóstico que comprende un  
50 anticuerpo de acuerdo con la invención.

**[0048]** Una realización preferida adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como medicamento. Una realización preferida adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso  
55 como un medicamento en el tratamiento de trastornos de células plasmáticas. Una realización preferida adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento del mieloma múltiple. Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de trastornos de células plasmáticas tales como MM de mieloma múltiple u otros trastornos de células B que expresan BCMA. MM es una enfermedad maligna de células B



caracterizada por una expansión monoclonal y acumulación de células plasmáticas anormales en el compartimento de la médula ósea. El MM también implica la circulación de células B clonales con la misma reestructuración del gen IgG y la hipermutación somática. MM surge de una condición premaligna asintomática llamada gammapatía monoclonal de significado desconocido (MGUS), que se caracteriza por niveles bajos de células plasmáticas de médula ósea y una proteína monoclonal. Las células MM proliferan a baja velocidad. MM resulta de una aparición progresiva de múltiples cambios cromosómicos estructurales (por ejemplo, translocaciones desequilibradas). El MM implica la interacción mutua de células plasmáticas malignas y microambiente de médula ósea (por ejemplo, células estromales de médula ósea normales). Los signos clínicos del MM activo incluyen pico de anticuerpo monoclonal, células de plasma llenas de médula ósea, lesiones óseas líticas y destrucción ósea como resultado de la sobreestimulación de los osteoclastos (Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl 7: vii143-150). Otro trastorno de células B que implica células plasmáticas, es decir, que expresa BCMA, es el lupus eritematoso sistémico (LES), también conocido como lupus. El SLE es una enfermedad sistémica y autoinmune que puede afectar cualquier parte del cuerpo y se representa con el sistema inmune atacando las propias células y tejidos del cuerpo, lo que resulta en inflamación crónica y daño tisular. Es una reacción de hipersensibilidad de Tipo III en la cual los complejos inmunes de anticuerpos precipitan y causan una respuesta inmune adicional (Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337). Una realización preferida adicional de la invención es la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como un medicamento en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico.

**[0049]** En lo que respecta a anticuerpos biespecíficos contra BCMA y CD3, los inventores reconocen que un anticuerpo biespecífico contra BCMA y capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de células T (BCMA-TCB) que 1) está en un ensayo ELISA no reducido más de 20 % en su unión a las concentraciones de BCMA y APRIL relevantes en pacientes con Mieloma Múltiple, 2) preferiblemente está en un ensayo ELISA no reducido en más de 20 % en su unión a BCMA por concentraciones de BAFF relevantes en pacientes con Mieloma Múltiple, evita que la eficacia del BCMA-TCB para erradicar las células tumorales positivas a BCMA en pacientes con MM se vea negativamente afectada por la concentración de APRIL y BAFF en el suero o en el tumor (véanse también las figuras 1 y 2 y las descripciones de las figuras 1 y 2). Además, los inventores reconocen que un anticuerpo biespecífico contra BCMA y capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de células T (BCMA-TCB) que 1) está en un ensayo de citometría de flujo basado en células H929 no reducido más de 25 % en su unión a las concentraciones de BCMA y APRIL, que pueden ser relevantes en pacientes con Mieloma Múltiple, 2) preferiblemente en un ensayo de citometría de flujo basado en células H929 no reducido más de 25 % en su unión a las concentraciones de BCMA y APRIL que pueden ser relevantes en pacientes con Mieloma Múltiple, evita que la eficacia del BCMA-TCB para erradicar las células tumorales BCMA-positivas en pacientes con MM se vea negativamente afectada por la concentración de APRIL y BAFF en el suero o en el tumor (véanse también las figuras 1 y 2 y las descripciones de las figuras 1 y 2).

**[0050]** Además, los inventores reconocen que un anticuerpo biespecífico contra BCMA y capaz de unirse específicamente a un antígeno activador de células T (BCMA-TCB) que 1) no bloquea o aumenta la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de APRIL, 2) preferiblemente no bloquea ni aumenta la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de BAFF, y 3) no induce la activación de NF $\kappa$ B sin APRIL y preferiblemente sin BAFF evita que la eficacia de BCMA-TCB para erradicar las células tumorales BCMA-positivas en pacientes con MM se vea negativamente afectada por la concentración de APRIL y BAFF en el suero o en el tumor. Además, como BCMA-TCB no induce la activación de NF- $\kappa$ B sin APRIL y preferiblemente sin BAFF, la activación y el aumento de la supervivencia de células tumorales del sistema respiratorio BCMA-positivas no ocurre en caso de que el BCMA-TCB por cualquier razón no mate las células tumorales, p. ej. al no unirse a CD3 sino solo a las células tumorales. Además, la internalización del receptor también puede no ocurrir, lo que podría reducir la eficacia de BCMA-TCB.

**[0051]** Debido a que la eficacia de los anticuerpos habitualmente aumenta con la ocupación/concentración del tumor de TCB, el resultado con un BCMA-TCB sin un anticuerpo BCMA de acuerdo con esta invención podría ser de considerable variabilidad interpaciente en eficacia (p. ej., menos eficacia global, véanse también las Figuras 1 y 2). Además, en pacientes con niveles elevados de APRIL y BAFF en suero (p. ej., pacientes con mieloma múltiple) puede no ser necesario aumentar la dosis para un anticuerpo de acuerdo con esta invención ya que puede no verse afectada por la competencia del ligando. Por el contrario, las dosis para otros anticuerpos anti-BCMA que bloquean/compiten con ligandos pueden necesitar aumentarse en esos pacientes.

**[0052]** Otra ventaja del anticuerpo de acuerdo con la invención es una semivida de eliminación de aproximadamente 1 a 12 días que permite al menos una o dos veces por semana de administración. Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención se administra una o dos veces por semana preferiblemente por administración subcutánea (por ejemplo, preferiblemente en el intervalo de dosis de 0,25 a 2,5,

preferiblemente a 25 mg/m<sup>2</sup>/semana). Debido a las actividades de citotoxicidad superiores del anticuerpo según la invención, puede administrarse al menos a la misma magnitud del intervalo de dosis clínica (o incluso menor) en comparación con anticuerpos monoespecíficos convencionales o anticuerpos biespecíficos convencionales que no son biespecíficos de células T (es decir, no se unen a CD3 en un brazo). Se prevé que, para un anticuerpo de acuerdo con la invención, se prefiere la administración subcutánea en los entornos clínicos (por ejemplo, en el intervalo de dosis de 1 a 100 mg/m<sup>2</sup>/semana).

**[0053]** De acuerdo con la invención, OD se puede medir a 405 nm o a 450 nm (preferiblemente con los mismos resultados relativos, comparación sin APRIL o BAFF). De acuerdo con la invención, OD puede medirse con APRIL humano o murino o 450 nm BAFF (preferiblemente con los mismos resultados relativos, comparación sin APRIL o BAFF).

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**[0054]**

Figura 1. Propiedades de unión superiores de un anticuerpo anti-BCMA bloqueante no ligando/no competitivo frente a un anticuerpo anti-BCMA bloqueante ligando/competitivo; o un anti-BCMA bloqueante no ligando/no competitivo, que contiene TCB frente a un anticuerpo anti-BCMA bloqueante ligando/competitivo que contiene TCB en células BCMA unidas a placa mediante ELISA. En este gráfico, el aumento de las concentraciones (es decir, 10, 100, 1000 ng/ml) de APRIL soluble o BAFF representativo de los niveles encontrados en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple no altera la unión de un anticuerpo anti-BCMA bloqueante no ligando/no competitivo o anti-BCMA bloqueante no ligando/no competitivo que contiene TCB unido a BCMA unido a la placa (línea continua). Por el contrario, las altas concentraciones (es decir, 100 ng/ml a 1000 ng/ml) de APRIL soluble o BAFF representativas de los niveles encontrados en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple reducen la unión de un anticuerpo anti-BCMA bloqueante ligando/competitivo o anticuerpo anti-BCMA bloqueante ligando/competitivo que contiene TCB unido a BCMA unido a la placa (línea punteada). La concentración de anticuerpos anti-BCMA o TCB que contienen anti-BCMA con diferentes propiedades es preferiblemente una concentración(es) que varía de 0.1 pM a 200 nM ya que los niveles de APRIL o BAFF circulante adicional varían de 1 ng/ml (normal saludable) a 100 ng/ml (MM, sangre) y más allá (MM, tumor en la médula ósea).

Figura 2. Potencia superior en citotoxicidad de linfocitos T redirigidos de células de MM que expresan BCMA mediada por un anticuerpo biespecífico de linfocitos T que contiene un anticuerpo anti-BCMA bloqueante no ligando/no competitivo frente a un anticuerpo anti-BCMA bloqueante ligando/competitivo en un ensayo de liberación de LDH. En este gráfico, el aumento de las concentraciones (es decir, 10, 100, 1000 ng/ml) de APRIL soluble o BAFF representativo de los niveles encontrados en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple no altera la potencia de muerte de un anticuerpo biespecífico de células T que contiene un anticuerpo anti-BCMA bloqueante no ligando/no competitivo, específico para células de MM que expresan BCMA (línea continua). Por el contrario, las altas concentraciones (es decir, 100 ng/ml a 1000 ng/ml) de APRIL soluble o BAFF representativas de los niveles encontrados en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple disminuyen la potencia de muerte de un anticuerpo biespecífico de células T que contiene anticuerpo anti-BCMA bloqueante/competitivo específico para células de MM que expresan BCMA (línea de puntos). La concentración de biespecíficos de células T con anticuerpo anti-BCMA con diferentes propiedades es preferiblemente una concentración(es) que varía de 0,1 pM a 200 nM ya que los niveles de APRIL o BAFF circulante adicional van desde 1 ng/ml (normal saludable) a 100 ng/ml (MM, sangre) y más allá (MM, tumor en la médula ósea).

Figura 3. Anticuerpos biespecíficos preferidos que comprenden solo los fragmentos Fab (específicos para CD3 y BCMA) y la parte Fc como se especifica: (1) Fab BCMA-Fc-Fab CD3-Fab BCMA; (2) Fc-Fab CD3-Fab BCMA; (3) Fab CD3-Fab BCMA; (4) Fab CD3 - Fab BCMA - Fab BCMA. Preferiblemente, los Fab CD3 incluyen un cruce de canales CH1-CL para reducir el emparejamiento incorrecto de LC y los productos secundarios. Fab CD3 y Fab BCMA están vinculados entre sí con enlaces flexibles.

Figura 4. Expresión de BCMA en líneas celulares de mieloma múltiple. Aumento de la intensidad de fluorescencia media tras la unión de concentraciones crecientes del anticuerpo anti-BCMA (de 0,3 a 10 µg/ml) a las células H929 detectadas por citometría de flujo.

Figura 5. Unión de anticuerpos anti-BCMA en células de mieloma múltiple positivas para BCMA. La intensidad media de fluorescencia para los clones de IgG anti-BCMA se representó en función de las concentraciones de anticuerpos anti-BCMA (de 0,2 a 40 µg/ml); (A) clones 13C2, 17A5, 83A10 en células H929, (B) clones 13C2, 17A5, 83A10 en

células MKN45, (C) clones 13A4, 13D2, 14E1, 13A7, 14B11 en células H929 (D) clones 13A4, 13D2, 14E1, 13A7, 14B11 en células MKN45.

Figura 6. ELISA de competición. Se muestran los resultados de un ELISA de 7 clones Fab anti-BCMA seleccionados (13C2, 17A5, 83A19, 13A4, 13D2, 29B11, 13A7), a concentraciones de saturación de 500 o 1000 nM, que se unen a BCMA humano inmovilizado en presencia de un intervalo de concentración de APRIL murino (de 1.56 a 100 nM). En caso de no existir competencia, las señales permanecen constantes dentro de la variabilidad del ensayo a través del intervalo de concentración y las señales en presencia de APRIL murino son comparables a las de los pocillos control donde no se añadió APRIL murino. En caso de que haya competencia, se mide una reducción de la señal dependiente de la concentración.

Figura 7. Competencia de unión por FACS. Competencia de  $\Delta$ -APRIL con anticuerpos anti-BCMA detectados por citometría de flujo. La intensidad relativa de fluorescencia media de  $\Delta$  APRIL (señal FITC) utilizada a una concentración de 1000 ng / ml detectada en función de las concentraciones (1, 16 y 40  $\mu$ g / ml) de los clones de anticuerpos anti-BCMA 13A4, 13D2, 14E1, 14B11 en Células H929. La intensidad media de fluorescencia tras la unión de  $\Delta$  APRIL en presencia del control de isotipo se estableció en uno; las otras señales fueron normalizadas. La detección de la unión de APRIL a células H929 positivas para BCMA en presencia de anticuerpos anti-BCMA se midió a través de anticuerpo conjugado con fluorocromo anti-HA.

Figura 8. Competencia de unión por FACS. Competencia de anticuerpos anti-BCMA con  $\Delta$ -APRIL detectado por citometría de flujo. La intensidad relativa de fluorescencia media del anticuerpo anti BCMA (señal Alexa.Fluor 647) utilizada a una concentración de 40  $\mu$ g/ml para los clones de anticuerpos anti-BCMA 13A4, 13C7, 13D2, 14B11, 17A5, 83A10 en células RPMI detectadas en ausencia o presencia de  $\Delta$ -APRIL 1000 ng/ml. La mediana de la intensidad de fluorescencia tras la unión de anticuerpos anti-BCMA en ausencia de  $\Delta$ -APRIL se estableció en uno; las otras señales respectivas al anticuerpo anti-BCMA en presencia de  $\Delta$ -APRIL se normalizaron a ella. La detección de anticuerpos anti-BCMA que se unen a células RPMI positivas para BCMA en presencia de  $\Delta$ -APRIL se midió a través de anticuerpo anti-Fc conjugado con fluorocromo.

Figura 9. Competencia de anticuerpos anti-BCMA con  $\Delta$ -APRIL después de la incubación simultánea detectada por citometría de flujo. (A) La intensidad de fluorescencia media y la señal de fluorescencia relativa (señal Alexa.Fluor 647) de los clones de anticuerpo anti-BCMA 14B11, 13D2, 13A4, 17A5 y 83A10 a la concentración de 20  $\mu$ g/ml en presencia o ausencia de 2,5  $\mu$ g/mL  $\Delta$ -APRIL o (B) la intensidad de fluorescencia media y la señal de fluorescencia relativa de  $\Delta$ -APRIL (señal FITC) a una concentración de 2,5  $\mu$ g/ml de  $\Delta$ -APRIL y el anticuerpo anti-BCMA clon 83A10 (20  $\mu$ g/ml) (Alexa.Fluor 647 signal) se midieron. La detección del anticuerpo anti-BCMA en presencia de  $\Delta$ -APRIL con anticuerpo Fc antihumano conjugado con FITC se normalizó a la señal del clon del anticuerpo anti-BCMA en ausencia de  $\Delta$ -APRIL. La detección de  $\Delta$ -APRIL en presencia del clon de anticuerpo anti-BCMA con anticuerpo anti-HA conjugado Alexa.Fluor 647 se normalizó a la señal  $\Delta$ -APRIL en presencia del control de isotipo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

[0055] El término "BCMA", como se usa en el presente documento, se refiere a un objetivo de maduración de células B humanas, también conocido como BCMA; TR17\_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), que es un miembro de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral que se expresa preferentemente en células de plasma diferenciadas. El dominio extracelular de BCMA de acuerdo con UniProt de aminoácidos 1 - 54 (o 5-51). El término "anticuerpo contra BCMA, anticuerpo anti BCMA" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a BCMA.

[0056] El término "CD3 $\epsilon$  o CD3" como se usa en el presente documento se refiere a CD3 humano descrito en UniProt P07766 (CD3E\_HUMAN). El término "anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti CD3" se refiere a un anticuerpo que se une a CD3 $\epsilon$ . Preferiblemente, el anticuerpo comprende un VH de dominio variable que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como respectivamente CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y un VL de dominio variable que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como, respectivamente, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo comprende los dominios variables de SEQ ID NO: 7 (VH) y SEQ ID NO: 8 (VL). El término "anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti CD3" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CD3.

[0057] "Unión específica a CD3 o BCMA" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD3 o BCMA (los objetivos) con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil como agente terapéutico con CD3 o BCMA como objetivos. En algunas realizaciones, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD3 o BCMA a una proteína no

relacionada, no CD3 o no BCMA es aproximadamente 10 veces, preferiblemente > 100 veces menor que la unión del anticuerpo a CD3 o BCMA como se mide, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR), por ejemplo, Biacore®, inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o citometría de flujo (FACS). Preferiblemente, el anticuerpo que se une a CD3 o BCMA tiene una constante de disociación (Kd) de  $10^{-8}$  M o menos, preferiblemente de  $10^{-8}$  M a  $10^{-13}$  M, preferiblemente de  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  M. Preferiblemente el anticuerpo anti-CD3 y/o anti-BCMA se une a un epítipo de CD3 y/o BCMA que se conserva entre CD3 y/o BCMA de diferentes especies, preferiblemente entre humanos y macaco. "Anticuerpo biespecífico que se une específicamente a CD3 y BCMA" o "anticuerpo de acuerdo con la invención" se refiere a una definición respectiva de unión a ambos objetivos. Un anticuerpo que se une específicamente a BCMA (o BCMA y CD3) no se une a otros antígenos humanos. Por lo tanto, en un ELISA, los valores de OD para dichos objetivos no relacionados serán iguales o inferiores a los del límite de detección del ensayo específico, preferiblemente > 0,3 ng/ml, o igual o inferior a los valores OD de muestras de control sin BCMA fijado en placa o con células HEK293 no transfectadas.

**[0058]** El término "APRIL", como se usa en la presente memoria, se refiere a APRIL murino recombinante truncado (aminoácidos 106-241; NP\_076006). APRIL puede producirse como se describe en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18).

**[0059]** El término "BAFF" como se usa en el presente documento se refiere a BAFF humano truncado recombinante (UniProt Q9Y275 (TN13B\_HUMAN) que se puede producir como se describe en Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983). Preferiblemente un BAFF marcado con His se usa de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el BAFF marcado con His se produce clonando un fragmento de ADN que codifica los residuos 82-285 de BAFF en un vector de expresión, creando una fusión con una marca His N-terminal seguida de una escisión de trombina, lo que expresa dicho vector y escinde la proteína recuperada con trombina.

**[0060]** Los anticuerpos anti-BCMA se analizan por ELISA para la unión a BCMA humano usando BCMA unido a placa en presencia y ausencia de APRIL y/o BAFF. Para este ensayo, se usa una cantidad de BCMA unido a placa preferiblemente de 1,5 µg/ml y una concentración(es) que preferiblemente varía de 1 pM a 200 nM de anticuerpo anti-BCMA. Un anticuerpo BCMA para el que no se inhibe su unión a BCMA de acuerdo con la invención es un anticuerpo anti-BCMA "que no inhibe la unión de APRIL y/o BAFF a BCMA humano en un ensayo ELISA".

**[0061]** El término "NF-κB" como se usa en el presente documento se refiere a NF-κB p50 recombinante (número de acceso (P19838).

**[0062]** La actividad de NF-κB se mide mediante un ELISA de unión a ADN de un extracto de células NCI-H929 MM (CRL-9068™). Las células de MM NCIH929, sin tratar o tratadas con 0,1 µg/ml de TNF-α, 100 ng/ml de BAFF truncado HT tratado térmicamente, 100 ng/ml de BAFF truncado, 0,1 pM a 200 nM de control de isotipo, y con o sin 0,1 pM a 200 nM de anticuerpos anti-BCMA se incuban durante 20 min. La actividad de NF-κB se evalúa usando un ELISA funcional que detecta la señal quimioluminiscente de p65 unida a la secuencia consenso de NF-κB (US6150090).

**[0063]** Un anticuerpo que no bloquea la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más de 20 % y no reduce la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más de 20 % y no aumenta la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más de 20 % se considera que "no altera la activación de NF-κB dependiente de APRIL" en más de 20 % en comparación con la activación de NF-κB sin APRIL sin un anticuerpo de acuerdo con la invención (grupo de control); 20 % que representa la variabilidad estándar promedio entre los experimentos. Preferiblemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF-κB dependiente de APRIL en más de 15 %.

**[0064]** Un anticuerpo que no bloquea la activación de NF-κB dependiente de BAFF en más de 20 % y no reduce la activación de NF-κB dependiente de BAFF en más de 20 % y no aumenta la activación de NF-κB dependiente de BAFF en más de 20 % se considera "no alterar la activación de NF-κB dependiente de BAFF" en más de 20 % en comparación con la activación de NF-κB sin BAFF sin un anticuerpo de acuerdo con la invención (grupo de control); 20 % que representa la variabilidad estándar promedio entre los experimentos. Preferiblemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF-κB dependiente de BAFF en más de 15 %.

**[0065]** Un anticuerpo que no bloquea la activación de NF-κB sin APRIL y BAFF en más de 20 % y no reduce la activación de NF-κB sin APRIL y BAFF en más de 20 % y no aumenta la activación de NF-κB sin APRIL y BAFF en más de 20 % se considera "no alterar la activación de NF-κB sin APRIL y BAFF" en más de 20 % en comparación con la activación de NF-κB sin inducir con APRIL sin un anticuerpo según la invención (grupo de control); que

representa la variabilidad media estándar entre experimentos. Preferiblemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención no altera la activación de NF- $\kappa$ B sin APRIL y BAFF en más de 15 %.

**[0066]** Además, si se usa un anticuerpo de acuerdo con la invención en gran exceso, preferiblemente hasta 500 nM o 1000 nM de unión de dicho anticuerpo, no se reduce en 100 ng/ml de APRIL y preferiblemente por BAFF en más de 20 % y no altera la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de APRIL en más de 20 %, con y sin APRIL y preferiblemente con y sin BAFF en más de 20 %.

**[0067]** El término "objetivo" como se usa en la presente memoria significa BCMA o CD3. El término "primer objetivo y segundo objetivo" significa CD3 como primer objetivo y BCMA como segundo objetivo o medios BCMA como primer objetivo y CD3 como segundo objetivo.

**[0068]** El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo consiste en dos pares de una "cadena ligera" (LC) y una "cadena pesada" (HC) (tales pares de cadena ligera (LC)/cadena pesada se abrevian aquí como LC / HC). Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de tales anticuerpos son polipéptidos que consisten en varios dominios. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3 (clases de anticuerpos IgA, IgD e IgG) y opcionalmente el dominio constante de cadena pesada CH4 (clases de anticuerpos IgE e IgM). Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera VL y un dominio constante de cadena ligera CL. Los dominios variables VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los "dominios constantes" de la cadena pesada y de la cadena ligera no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un objetivo, pero exhiben diversas funciones efectoras.

**[0069]** El término "anticuerpo" incluye, p. ej., anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genéticamente modificados (anticuerpos variantes o mutantes) siempre que se conserven sus propiedades características. Son especialmente preferidos los anticuerpos humanos o humanizados, especialmente como anticuerpos recombinantes humanos o humanizados.

**[0070]** Los términos "anticuerpo biespecífico" y "anticuerpo según la invención" como se usan en la presente memoria se refieren a un anticuerpo en el que uno de los dos pares de cadenas ligeras y pesadas (HC/LC) se une específicamente a CD3 y el otro uno es específicamente vinculante para BCMA.

**[0071]** Hay cinco tipos de cadenas pesadas de anticuerpos de mamíferos indicadas por las letras griegas:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$  (Janeway CA, Jr et al. (2001). Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing). El tipo de cadena pesada presente define la clase de anticuerpo; estas cadenas se encuentran en anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente (Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). Human Physiology, 4ª edición, Thomson Learning). Distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición;  $\alpha$  y  $\gamma$  contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que  $\mu$  y  $\epsilon$  tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante y la región variable. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en anticuerpos de distinto isotipo. Las cadenas pesadas  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  tienen una región constante compuesta de tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 (en una línea), y una región bisagra para mayor flexibilidad (Woof J, Burton D Nat Rev Immunol 4 (2004) 89- 99); las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\epsilon$  tienen una región constante compuesta de cuatro dominios constantes CH1, CH2, CH3 y CH4 (Janeway CA, Jr et al. (2001). Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing). La región variable de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes células B, pero es la misma para todos los anticuerpos producidos por una sola célula B o clon de célula B. La región variable de cada cadena pesada tiene una longitud de aproximadamente 110 aminoácidos y está compuesta por un único dominio de anticuerpo.

**[0072]** En los mamíferos, solo hay dos tipos de cadena ligera, que se denominan lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Una cadena ligera tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante CL y un dominio variable VL. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Preferiblemente, la cadena ligera es una cadena ligera kappa ( $\kappa$ ), y el dominio constante CL se deriva preferiblemente de una cadena ligera kappa (K) (el dominio constante CK).

**[0073]** Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se usan en

la presente memoria se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

**[0074]** Los "anticuerpos" según la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferiblemente IgG o IgE), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2, preferiblemente IgG1), donde ambos anticuerpos, a partir de los cuales deriva el anticuerpo biespecífico bivalente según la invención, tienen una parte Fc de la misma subclase (por ejemplo, IgG1, IgG4 y similares, preferiblemente IgG1), preferiblemente del mismo alotipo (por ejemplo, caucásico).

**[0075]** Un "fragmento Fab de un anticuerpo" como se usa en este documento es un fragmento de un anticuerpo que se une a antígenos. Está compuesto por un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesadas (CHI y VH) y la cadena ligera (CL y VL). De acuerdo con la invención, los dominios de la cadena pesada y ligera de un fragmento Fab no están unidos químicamente entre sí y, por lo tanto, no son scFvs (fragmentos variables monocatenarios).

**[0076]** Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por los expertos en la técnica y se define sobre la base de la escisión con papaína de anticuerpos. Los anticuerpos de acuerdo con la invención contienen como parte Fc, preferiblemente una parte Fc derivada de origen humano y preferiblemente todas las otras partes de las regiones constantes humanas. La parte Fc de un anticuerpo está directamente implicada en la activación del complemento, la unión a C1q, la activación de C3 y la unión al receptor de Fc. Mientras que la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento depende de ciertas condiciones, la unión a C1q es causada por sitios de unión definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión son conocidos en la técnica más avanzada y se describen, p. ej., por Lukas, T.J., y col., J. Immunol. 127 (1981) 2555 - 2560; Brunhouse, R., and Cebra, J. J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907 - 917; Burton, D.R., y col., Nature 288 (1980) 338 - 344; Thommesen, J.E., y col., Mol. Immunol. 37 (2000) 995 - 1004; Idusogie, E.E., y col., J. Immunol. 164 (2000) 4178 - 4184; Hezareh, M., y col., J. Virol. 75 (2001) 12161 - 12168; Morgan, A., y col., Immunology 86 (1995) 319 - 324; y EP 0 307 434. Tales sitios de unión son, p. L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat, ver a continuación). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 generalmente muestran activación del complemento, unión a C1q y activación de C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento, no se une a C1q y no activa a C3. Preferiblemente, la parte Fc es una parte Fc humana. Preferiblemente, la parte Fc es una parte IgG1Fc humana.

**[0077]** Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende como parte Fc una variante Fc de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje, comprendiendo dicha variante Fc una sustitución de aminoácido en la posición Pro329 y al menos una sustitución de aminoácido adicional, donde los residuos están numerados según el índice UE de Kabat, y en el que dicho anticuerpo muestra una afinidad reducida por FcγRIIIA humano y/o FcγRII y/o FcγRI en comparación con un anticuerpo que comprende la región Fc de IgG de tipo salvaje, y en el que la ADCC inducida por dicho anticuerpo es reducida hasta al menos 20 % de la ADCC inducida por el anticuerpo que comprende una región Fc de IgG humana de tipo salvaje. En una realización específica, Pro329 de una región Fc de tipo salvaje en el anticuerpo de acuerdo con la invención se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande como para destruir el sándwich de prolina dentro de la interfaz del receptor Fc/Fcγ, que se forma entre la prolina329 de Fc y los residuos de triptófano Trp 87 y la Punta 110 de FcγRIII (Sondermann y col.: Nature 406, 267-273 (20 de julio de 2000)). En un aspecto adicional de la invención, al menos una sustitución de aminoácidos adicional en la variante Fc es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S y aún en otra realización dicha al menos una sustitución de aminoácidos adicional es L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana. Dichas variantes de Fc se describen en detalle en el documento WO2012130831.

**[0078]** El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, generalmente preparada por técnicas de ADN recombinante. Se prefieren los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable de murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la región constante ha sido modificada o cambiada por la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o la unión al receptor Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de clase conmutada". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección génica son

bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851 - 6855; patentes de EE.UU. Nro. 5.202.238 y 5.204.244.

**[0079]** El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, se injerta una CDR murina en la región flanqueante de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., y col., Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., y col., Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferidas corresponden a aquellas que representan secuencias que reconocen los objetivos indicados anteriormente para anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente por la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o unión al receptor Fc (FcR).

**[0080]** El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos en la exposición diana (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551 - 2555; Jakobovits, A., y col., Nature 362 (1993) 255 - 258; Bruggemann, M., y col., Year Immunol., 7 (1993) 33 - 40). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom, HR and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, JD, y col., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581 - 597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985), y Boerner, P., y col., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como ya se mencionó para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano" como se usa en este documento también comprende anticuerpos que están modificados en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión C1q y/o unión de FcR, por ejemplo, mediante "cambio de clase", es decir, cambio o mutación de las partes Fc (por ejemplo, de la mutación IgG1 a IgG4 y/o IgG1/IgG4).

**[0081]** El término "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 anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NSO o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reorganizada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

**[0082]** El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH), como se usa en este documento denota cada uno de los pares de cadenas ligeras y pesadas que participan directamente en la unión del anticuerpo al objetivo. Los dominios de cadenas ligeras y pesadas humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión objetivo. Las regiones de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y, por lo tanto, proporcionan un objeto adicional de la invención.

**[0083]** Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a objetivo de un anticuerpo" cuando se usan en la presente memoria se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la

unión al blanco. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable como se define aquí. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden desde el extremo N hasta el extremo C los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena están separadas por tales aminoácidos estructurales. Especialmente, CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión al objetivo. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

10 **[0084]** El dominio de cadena pesada constante CH1 mediante el cual se reemplaza el dominio de cadena pesada CH3 puede ser de cualquier clase de Ig (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). El dominio de cadena ligera constante CL por el cual se reemplaza el dominio de cadena pesada CH3 puede ser del tipo lambda ( $\lambda$ ) o kappa ( $\kappa$ ), preferiblemente el tipo kappa ( $\kappa$ ).

15 **[0085]** El término "diana" o "molécula diana" como se usa en la presente memoria se usa intercambiable y se refiere a BCMA humana y CD3  $\zeta$  humana.

**[0086]** El término "epítipo" incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el determinante del epítipo incluye agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un objetivo que está unido por un anticuerpo.

**[0087]** En general, hay dos vectores que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de dicho anticuerpo que se unen específicamente al primer objetivo, y otros dos vectores que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de dicho anticuerpo que se unen específicamente al segundo objetivo. Uno de los dos vectores codifica la cadena ligera respectiva y el otro de los dos vectores codifica la cadena pesada respectiva. Sin embargo, en un método alternativo para la preparación de un anticuerpo biespecífico según la invención, solo un primer vector que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo se une específicamente al primer objetivo y solo un segundo vector que codifica la cadena ligera y la cadena pesada de el anticuerpo que se une específicamente al segundo objetivo puede usarse para transformar la célula hospedadora.

**[0088]** El término "molécula de ácido nucleico o ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

**[0089]** Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las designaciones de este tipo incluyen progenie. De este modo, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye una progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que la que se crió en la célula originalmente transformada. Cuando se propongan designaciones distintas, quedará claro a partir del contexto.

45 **[0090]** El término "transformación" como se usa en la presente memoria se refiere al proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula huésped. Si las células sin barreras formidables de la pared celular se usan como células huésped, la transfección se lleva a cabo, p. ej. mediante el método de precipitación con fosfato de calcio descrito por Graham y Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en las células, tales como por inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Si se usan células procariotas o células que contienen construcciones de paredes celulares sustanciales, p. ej. un método de transfección es el tratamiento con calcio usando cloruro de calcio como se describe por Cohen SN, y col., *PNAS* 1972, 69 (8): 2110-2114.

**[0091]** La producción recombinante de anticuerpos usando transformación es bien conocida en la técnica más avanzada y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S. C, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183 - 202; Geisse, S., y col., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271 - 282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151 - 161; Werner, R.G., y col., *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880, así como en los documentos US6331415 y US4816567.



**[0092]** Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se transcribe un ácido nucleico en ARNm y/o al proceso mediante el cual el ARNm transcrito (también denominado transcrito) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Las transcripciones y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente producto génico. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión en una célula eucariótica puede incluir el corte y empalme del ARNm.

**[0093]** Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular autorreplicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células hospedadoras. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen los vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

**[0094]** Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula hospedadora apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" normalmente se refiere a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

**[0095]** Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención se producen preferiblemente por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos en la técnica más avanzada y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con aislamiento posterior del polipéptido del anticuerpo y usualmente purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de la proteína, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de estos se insertan en vectores de expresión por métodos estándar. La expresión se realiza en células hospedadoras procariotas o eucariotas apropiadas como células CHO, células NSO, células SP2/0, células HEK293, células COS, levadura o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis). Los anticuerpos biespecíficos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se realiza con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej. otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas habituales, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, cromatografía en columna y otras bien conocidas en la técnica. Véase Ausubel, F., y col., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

**[0096]** La expresión en células NSO se describe, por ejemplo, por Barnes, L.M., y col., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M., y col., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., y col., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833 - 3837; Carter, P., et al col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285 - 4289; y Norderhaug, L., y col., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77 - 87. Un sistema de expresión transitoria preferido (HEK293) se describe por Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71 83 y por Schlaeger, E.-J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

**[0097]** Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

**[0098]** El ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está colocado de manera que facilite la traducción. En general, "operativamente vinculado" significa que las

**[0099]** secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra por ligadura en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

**[0100]** Los anticuerpos biespecíficos se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN o ARN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales.

Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células hospedadoras como células HEK293, células CHO o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

5

**[0101]** Las variantes (o mutantes) de secuencias de aminoácidos del anticuerpo biespecífico se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo o mediante síntesis de nucleótidos. Sin embargo, tales modificaciones pueden realizarse solo en un rango muy limitado, p. ej. como se describió anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpos mencionadas anteriormente, tales como el isotipo de IgG y la unión a la diana, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

10

**[0102]** Los aglutinantes biespecíficos de células T (TCB) tienen una potencia dependiente de la concentración/receptor de células tumorales muy alta en la destrucción celular (por ejemplo, CE50 en ensayos de eliminación de células in vitro en el rango picomolar inferior o inferior; Dreier y col., Int J Cancer 2002), el aglutinante biespecífico de células T (TCB) se administra a dosis mucho más bajas que los anticuerpos mono-específicos convencionales. Por ejemplo, blinatumomab (CD19xCD3) se administra a una dosis intravenosa continua de 5 a 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  (es decir, solo 0,35 a 0,105  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ ) para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda o 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  para el tratamiento del linfoma no Hodgkin, y las concentraciones séricas en estas dosis están en el rango de 0,5 a 4 ng/ml (Klinger y col., Blood 2012; Topp y col., J Clin Oncol 2011; Goebeler y col., Ann Oncol 2011). Debido a que dosis bajas de TCB pueden ejercer una alta eficacia en pacientes, se prevé que para un anticuerpo de acuerdo con la invención la administración subcutánea sea posible y preferida en entornos clínicos (preferiblemente en el intervalo de dosis de 0,25 a 2,5  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ ). Incluso en estas bajas concentraciones/dosis/ocupaciones de receptores, TCB puede causar considerables eventos adversos (Klinger y col., Blood 2012). Por lo tanto, es fundamental controlar la ocupación/coertura de las células tumorales. En pacientes con niveles altos y variables de APRIL y BAFF en suero (por ejemplo, pacientes con mieloma múltiple, Moreaux y col., 2004; Blood 103 (8): 3148-3157), el número de TCB unido a la ocupación de células tumorales del sistema respiratorio, puede verse considerablemente influenciado por APRIL/BAFF. Pero al usar dicho anticuerpo de esta invención, la ocupación de las células tumorales respectivamente eficacia/seguridad, puede no necesitar aumentar la dosis para un anticuerpo de acuerdo con esta invención ya que dicho anticuerpo puede no verse afectado por la competición de ligando de APRIL/BAFF. Otra ventaja del anticuerpo según la invención se basa en la inclusión de una porción Fc, que aumenta la semivida de eliminación a ~ 12 días y permite al menos una o dos administraciones/semana en comparación con TCB sin una porción Fc (p. ej. blinatumomab) que deben administrarse por vía intravenosa y continua con una bomba transportada por los pacientes.

35

**Tabla 1. Secuencias de anticuerpos**

Anticuerpo BCMA	SEQ ID NO:							
	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
13C2	17	27	37	47	57	67	77	87
17A5	18	28	38	48	58	68	78	88
83A10	19	29	39	49	59	69	79	89
13A4	20	30	40	50	60	70	80	90
13D2	21	31	41	51	61	71	81	91
14B11	22	32	42	52	62	72	82	92
14E1	23	33	43	53	63	73	83	93
29B11	24	34	44	54	64	74	84	94
29F3	25	35	45	55	65	75	85	95
13A7	26	36	46	56	66	76	86	96

**[0103]** Los siguientes ejemplos, listados de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

## MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

**[0104]** La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, EA, y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se numeran y se refieren de acuerdo con la numeración de la UE (Edelman, GM, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85; Kabat, EA, y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

### Técnicas de ADN recombinante

**[0105]** Se usaron métodos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook y col., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos de biología molecular se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A. y col., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242. *Gene synthesis*

**[0106]** Los segmentos de genes deseados se preparan a partir de oligonucleótidos preparados por síntesis química. Los segmentos génicos de 600 - 1800 pb de longitud, que están flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares, se ensamblan por reasociación y ligamiento de oligonucleótidos que incluyen amplificación por PCR y posteriormente se clonan a través de los sitios de restricción indicados, p. ej. KpnI/Sad o AscI/PacI en un vector de clonación pGA4 basado en pPCRScrip (Stratagene). Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirman por secuenciación de ADN. Los fragmentos de síntesis génica se ordenan de acuerdo con las especificaciones dadas en Geneart (Regensburg, Alemania).

### Determinación de las secuencias de ADN

**[0107]** Las secuencias de ADN se determinaron por secuenciación de doble cadena.

### Análisis de secuencias de ADN y proteínas y gestión de datos de las secuencias

**[0108]** El paquete de software GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10.2 y el paquete Vector Advance NT1 de Infomax versión 8.0 se utiliza para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

### Vectores de expresión

**[0109]**

a) Para la expresión de los anticuerpos descritos, se aplican las variantes de plásmidos de expresión para expresión transitoria (p. ej., en células HEK293 EBNA o HEK293-F) basadas en una organización de ADNc con un promotor CMV-Intrón A o en una organización genómica con un promotor CMV. Además del casete de expresión de anticuerpos, los vectores contienen un origen de replicación que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. La unidad de transcripción del gen del anticuerpo se compone de los siguientes elementos:

- sitio (s) de restricción únicos en el extremo 5', el intensificador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano,
- seguido de la secuencia de Intrón A en el caso de la organización de cDNA,
- una región 5' no traducida de un gen de anticuerpo humano,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina,
- la cadena del anticuerpo humano (de tipo salvaje o con intercambio de dominios) ya sea como ADNc o como organización genómica con una organización de exón-intrón de inmunoglobulina
- una región 3' no traducida con una secuencia de señal de poliadenilación, y
- sitio(s) de restricción únicos en el extremo 3'

Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos descritas como se describe a continuación se

generan por PCR y/o síntesis génica y se ensamblan con métodos y técnicas recombinantes conocidos por conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, p. ej. usando sitios de restricción únicos en los respectivos vectores. Las secuencias de ácido nucleico subclonado se verifican por secuenciación de ADN. Para las transfecciones transitorias, se preparan cantidades mayores de los plásmidos mediante preparación de plásmido a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

#### b) Generación de vectores de expresión de anticuerpos y antígenos

La región variable de las secuencias de ADN de la cadena pesada y ligera se subclonó en el marco con la cadena pesada constante IgG1 humana o la cadena ligera constante IgG1 hum previamente insertada en el vector de expresión de mamífero receptor respectivo. La expresión del anticuerpo fue impulsada por un promotor de MPSV quimérico que comprende un potenciador de CMV y un promotor de MPSV seguido por un 5' UTR, un intrón y un elemento kappa MAR. La transcripción se termina mediante una secuencia de señal poliA sintética en el extremo 3' del CDS. Todos los vectores llevan una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige a proteínas para la secreción en células eucarióticas. Además, cada vector contiene una secuencia de EBV OriP para la replicación del plásmido episomal en células que expresan EBV EBNA.

**[0110]** Los antígenos que se han usado para las campañas de selección de presentación en fagos y para caracterizar las propiedades de unión de los anticuerpos seleccionados se expresaron a partir de vectores de expresión de antígenos de mamífero con secuencias de ADN pre-insertadas que codifican marcadores C-terminales. Se ha usado un marcador Avi para la biotilación in vivo o in vitro del antígeno respectivo. Para la purificación y homodimerización o heterodimerización del antígeno, se fusionó un hum IgG1 Fc wt o un Fc knob para el término C del casete de expresión de antígeno. La expresión del antígeno fue dirigida por un promotor de MPSV quimérico que comprende un potenciador de CMV y un promotor de MPSV seguido por un 5' UTR, un intrón y un elemento kappa MAR. La transcripción se terminó mediante una secuencia de señal poliA sintética en el extremo 3' del CDS. Todos los vectores llevan una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige a proteínas para la secreción en células eucarióticas. Además, cada vector contiene una secuencia de EBV OriP para la replicación del plásmido episomal en células que expresan EBV EBNA.

#### Técnicas de cultivo celular

**[0111]** Las técnicas de cultivo celular habituales se usan como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

#### 35 Expresión transitoria en células HEK293

**[0112]** Los anticuerpos biespecíficos se expresan por cotransfección transitoria de los respectivos plásmidos de expresión en HEK293-EBNA que crece adherentemente o en células HEK293-F que crecen en suspensión como se describe a continuación.

#### a) Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-EBNA

**[0113]** Los anticuerpos biespecíficos se expresan mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de expresión respectivos (por ejemplo, que codifican la cadena pesada y la pesada modificada, así como la luz correspondiente y la cadena ligera modificada) en células HEK293-EBNA de crecimiento adherente (células de riñón embrionario humano línea celular 293 que expresa el objetivo nuclear del virus de Epstein-Barr; número de depósito de la colección de cultivo estadounidense ATCC # CRL-10852, lote 959 218) cultivadas en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco, Gibco) suplementado con 10 % de FCS con IgG ultra bajo (suero de ternera fetal, Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), y Geneticina 250 µg/ml (Gibco). Para la transfección, el reactivo de transfección FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) se utiliza en una relación de reactivo FuGENE™ (µl) a ADN (µg) de 4:1 (que varía de 3:1 a 6:1).

**[0114]** Las proteínas se expresan a partir de los plásmidos respectivos usando una relación molar de plásmidos que codifican cadena ligera y cadena pesada (modificada y de tipo salvaje) de 1:1 (equimolar) que varían de 1:2 a 2:1, respectivamente. Las células se alimentan el día 3 con L Glutamina ad 4 mM, Glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. Los sobrenadantes de cultivo celular que contienen anticuerpo biespecífico se recogen del día 5 al 11 después de la transfección por centrifugación y se almacenan a -200 °C. Información general con respecto a la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, p. ej., las células HEK293, se da en: Meissner, P. y col., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

**b) Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F**

**[0115]** Los anticuerpos biespecíficos se generan por transfección transitoria de los plásmidos respectivos (por ejemplo, codificando la cadena pesada y pesada modificada, así como la correspondiente cadena ligera y ligera modificada) usando el sistema HEK293-F (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, células HEK293-F (Invitrogen) que crecen en suspensión en un matraz de agitación o en un fermentador agitado en medio de expresión FreeStyle 293 exento de suero (Invitrogen) se transfectan con una mezcla de los cuatro plásmidos de expresión y 293fectina o fectina (Invitrogen). Para un matraz de agitación de 2 L (Corning), las células HEK293-F se siembran a una densidad de  $1,0 \times 10^6$  células/ml en 600 ml y se incuban a 120 rpm, 8 % de CO<sub>2</sub>. El día después de transfectar las células a una densidad celular de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml con aproximadamente 42 ml de mezcla de A) 20 ml de Opti-MEM (Invitrogen) con 600 µg de ADN plasmídico total (1 µg/ml) que codifica la cadena pesada o cadena pesada modificada, respectivamente, y la correspondiente cadena ligera en una proporción equimolar y B) 20 ml de Opti -MEM + 1,2 mL de 293 fectina o fectina (2 µl/mL). De acuerdo con el consumo de glucosa, la solución de glucosa se agrega durante el curso de la fermentación. El sobrenadante que contiene el anticuerpo secretado se cosecha después de 5-10 días y los anticuerpos se purifican directamente del sobrenadante o el sobrenadante se congela y se almacena.

**Determinación de la proteína**

**[0116]** La concentración de proteína de anticuerpos y derivados purificados se determina determinando la densidad óptica (OD) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos según Pace y col., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

**25 Determinación de la concentración de anticuerpos en sobrenadantes**

**[0117]** La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivo celular se estima por inmunoprecipitación con perlas de agarosa de proteína A (Roche). 60 µL de perlas de Agarosa de Proteína A se lavan tres veces en TBS-NP40 (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 al 1 %). Posteriormente, se aplica 1 - 15 ml de sobrenadante de cultivo celular a las perlas de Agarosa de Proteína A preequilibradas en TBS-NP40. Después de incubar durante 1 h a temperatura ambiente, las perlas se lavan en una columna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato 2x (2xPBS, Roche) y brevemente cuatro veces con 0,5 mL de Na-citrato 100 mM pH 5,0. El anticuerpo unido se eluye mediante la adición de 35 µl de tampón de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen). La mitad de la muestra se combina con NuPAGE® Sample Reducing Agent o se deja sin reducir, respectivamente, y se calienta durante 10 min a 70 °C. En consecuencia, se aplican 5-30 µl a un 4-12 % NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (con tampón MOPS para SDS-PAGE no reducido y tampón MES con aditivo de tampón de funcionamiento antioxidante NuPAGE® (Invitrogen) para SDS-PAGE reducido) y teñido con azul de Coomassie.

**[0118]** La concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivos celulares se mide cuantitativamente mediante cromatografía de HPLC por afinidad. Brevemente, los sobrenadantes del cultivo celular que contienen anticuerpos y derivados que se unen a Proteína A se aplican a una columna Applied Biosystems Poros A/20 en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM, citrato sódico 100 mM, pH 7,4 y se eluyen de la matriz con NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, pH 2,5 en un sistema Agilent HPLC 1100. La proteína eluida se cuantifica por absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. Un anticuerpo IgG1 estándar purificado sirvió como estándar.

**[0119]** Alternativamente, la concentración de anticuerpos y derivados en sobrenadantes de cultivos celulares se mide mediante Sandwich-IgG-ELISA. Brevemente, las placas de microtitulación de Streptavidin A-96 StreptaWell High Bind Streptavidin (Roche) están recubiertas con 100 µL/pocillo de molécula de captura de IgG anti-humana biotinilada F(ab')<sub>2</sub>-hFcγ BI (Dianova) a 0,1 mg/mL para 1 hora a temperatura ambiente o alternativamente durante la noche a 4 °C y posteriormente se lava tres veces con 200 µl/pocillo de PBS, 0,05 % de Tween® (PBST, Sigma). Se añaden a los pocillos 100 µl/pocillo de una serie de diluciones en PBS (Sigma) del respectivo anticuerpo que contiene sobrenadantes de cultivo celular y se incuban durante 1 - 2 h en un agitador de microtitulación a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan tres veces con 200 µL/pocillo de PBST y el anticuerpo unido se detecta con 100 µl de F(ab')<sub>2</sub>-hFcγ POD (Dianova) a 0,1 µg/mL como anticuerpo de detección durante 1-2 h en un agitador de microtitulación a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección no unido se lava tres veces con 200 µL/pocillo de PBST y el anticuerpo de detección unido se detecta mediante la adición de 100 µL de ABTS/pocillo. La determinación de la absorbancia se realiza en un espectrómetro Tecan Fluor a una longitud de onda de medición de 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm).

## Purificación de proteínas

**[0120]** Las proteínas se purifican a partir de sobrenadantes de cultivo celular filtrados que se refieren a protocolos estándar. En resumen, los anticuerpos se aplican a una columna de Proteína A-Sefarosa (GE healthcare) y se lavan con PBS. La elución de anticuerpos se logra a pH 2,8 seguido de neutralización inmediata de la muestra. La proteína agregada se separa de anticuerpos monoméricos por cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en histidina 20 mM, 150 mM NaCl pH 6,0. Las fracciones de anticuerpo monomérico se agrupan, se concentran si es necesario usando, p. ej. un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congela y almacena a -20 °C. Parte de las muestras se proporcionan para posteriores análisis de proteínas y caracterización analítica, p. ej. mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño o espectrometría de masas.

## SDS-PAGE

**[0121]** El sistema de gel Pre-Cast NuPAGE® (Invitrogen) se usa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usan 10 % o 4-12 % de geles de NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) y un MES NuPAGE® (geles reducidos, con aditivo de tampón de funcionamiento antioxidante NuPAGE®) o tampón de funcionamiento MOPS (geles no reducido).

## Cromatografía de exclusión por tamaño analítico

**[0122]** La cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación de la agregación y el estado oligomérico de los anticuerpos se realiza por cromatografía HPLC. Brevemente, los anticuerpos purificados de Proteína A se aplican a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100 o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un Dionex HPLC-System. La proteína eluida se cuantifica por absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. BioRad Gel Filtration Standard 151-1901 sirvió como estándar.

## Espectrometría de masas

**[0123]** La masa desglicosilada total de anticuerpos de cruce se determina y se confirma a través de espectrometría de masas de ionización con electrospray (ESI-MS). Brevemente, 100 mg de anticuerpos purificados se desglicosilaron con 50 ml de N-glicosidasa F (PNGasa F, ProZyme) en 100 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7 a 37 °C durante 12-24 horas a una concentración de proteína de hasta 2 mg/ml y posteriormente desalado mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa de las cadenas pesadas y ligeras respectivas se determina mediante ESI-MS después de la desglicosilación y la reducción. En resumen, se incuban 50 µg de anticuerpo en 115 µl con 60 µl de TCEP IM y 50 µl de hidrócloruro de guanidina 8 M, posteriormente desalado. La masa total y la masa de las cadenas pesadas y ligeras reducidas se determinan a través de ESI-MS en un sistema Q-Star Elite MS equipado con una fuente NanoMate®.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos anti-BCMA

#### Ejemplo 1A. Producción de antígenos y reactivos de herramientas

##### Ejemplo 1A1. Dominio extracelular de BCMA recombinante, soluble y humano

**[0124]**

a) Se produce un dominio extracelular de BCMA humano, soluble y recombinante ("ECD de BCMA") como se describe en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18). Brevemente, el dominio humano BCMA extracelular (ECD; aminoácidos 5-51; NP\_001183) se amplifica con cebador directo 5'-AAGCTT**GGATCC**ATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCC-3 (SEQ ID NO: 11) que incorpora un sitio *Bam*H1 (negrita, subrayado) y el cebador inverso 5'-GAATTC**GCGGCCGC**TCATCCTTTCACTGAATTGGTCACACTTGCATTAC-3 (SEQ ID NO: 12) que incorpora un codón de terminación (cursiva) y sitio NotI (en negrita, subrayado) usando el clon 687194 de IMAGE (Invitrogen) como una plantilla de PCR. El producto de PCR se clona en un vector de expresión que comprende un gen de

- glutación S-transferasa corriente arriba de glutación S-transferasa (GST), transformado en una cepa de *E. coli* que comprende el gen de ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 y la proteína inducida es purificada a 4 °C en un ÄKTAexplorer (GE Healthcare). El sedimento celular se lisa en 1:15 w/v de tampón B-PER (Pierce) que contiene inhibidor de proteasa y lisozima. El extracto se suplementa con 1 a 2 µg/ml de DNasa I (Sigma), se agita durante 20 minutos más y se ajusta a pH 7,5. La proteína de fusión soluble se recoge después de la centrifugación a 31,000 x g durante 20 min (Beckman) y se carga en una columna de glutación Sefarosa 4 FF (GE Healthcare) preequilibrada con tampón B-PER. La columna se lava con 4 volúmenes de columna (CV) de tampón B-PER, 3 CV cada uno de los tampones de lavado 1 y 2 (Pierce), seguido de un lavado de columna final con 5 CV Tris 50 mmol/l (pH 8,0), 0,15 moles/L NaCl. El BCMA etiquetado con GST se eluye con 20 mmol/l de glutación reducido en 50 mmol/l de Tris (pH 8,0) y se dializa frente a PBS (pH 7,4) usando un portaobjetos Slide-A-Lyzer de 3500 MWCO (Pierce). Para la eliminación de la etiqueta GST, BCMA: GST se trata con trombina en Tris 50 mmol/l (pH 8,0), NaCl 0,15 mol/l, mientras que se une al glutación sefrosa. La trombina liberada se captura luego mediante una columna de benzamidina Sefarosa (GE Healthcare). El BCMA escindido con GST se eluye de la columna con 3 a 5 CV 50 mmol/l de Tris (pH 8,0), 0,15 mol/l de NaCl, y se dializa frente a PBS (pH 7,4). La eliminación de la trombina se confirma analizando las fracciones de la actividad de la trombina utilizando el sustrato cromogénico S-2238 (Chromogenix, DiaPharma). La concentración de proteína está determinada por A280. Todas las proteínas purificadas se analizan mediante SDS-PAGE y mediante cromatografía de exclusión por tamaño de HPLC TSK Gel G3000SW (Tosoh Bioscience).
- 20 Se produce una variante biotinilada de BCD de BCMA ("BCMA-ECD-biot") como se describió anteriormente usando los mismos procedimientos con las siguientes modificaciones. Se añade una secuencia de ADN que codifica una etiqueta de Avi-His, mediante amplificación por PCR, en el marco corriente abajo en el extremo 3' del primer producto de PCR descrito anteriormente. Este nuevo y segundo producto de PCR se subclona luego en el vector de expresión pGEX4T1 y luego se cotransforma en bacterias junto con un vector para la expresión de la enzima BirA para la biotinilación *in vivo* de la etiqueta Avi. Los pasos de producción y purificación restantes se realizan como se indicó anteriormente para BCMA-ECD.
- b) Los dominios extracelulares de BCMA humano, macaco y murino que se usaron como antígenos para selecciones de presentación en fagos se expresaron transitoriamente como fusión monoclonal Fc N terminal en células HEK 293T y sitios *in vivo* biotinilados específicamente mediante la coexpresión de biotina ligasa BirA en la secuencia de reconocimiento de etiqueta avi localizada en el extremo C de la porción Fc que porta la cadena del receptor (cadena del botón Fc). Los dominios extracelulares de BCMA humano, macaco y murino comprendían metionina 4 a asparagina 53, metionina 4 a asparagina 52 y alanina 2 a treonina 49, respectivamente. Estos se fusionaron en el extremo N a la bisagra de una IgG1 humana permitiendo la heterodimerización con una porción de Fc de IgG1 humana no fusionada (cadena de agujeros) por tecnología knobs-into-holes.

#### Ejemplo 1A2. APRIL murina truncada recombinante

##### [0125]

- 40 a) La APRIL murina truncada recombinante se produce como se describe en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18). Brevemente, APRIL murina (residuos 106-241; NP\_076006) se amplifica a partir del clon de IMAGE 5290965 (Invitrogen) y para la amplificación se usan el cebador directo específico clonado en un vector de expresión bacteriano fusionado en el extremo COOH del gen 5-  
 45 ACGTTAAGATCTCCACTCAGTCCTGCATCTTGTTCAGTTAAC-3 (SEQ ID NO: 13) y el cebador inverso 5-AACGTTGCGGCCGCTAGTTTCACAAACCCAGG-3 (SEQ ID NO: 14). Los sitios BglII y NotI (en negrita, subrayados) en los cebadores directo e inverso, respectivamente, se usan para clonar el fragmento de PCR resultante en un vector de expresión bacteriano fusionado en el extremo COOH a tiorredoxina. La construcción se transforma en una cepa K-12 de *Escherichia coli* que comprende una mutación en el gen de la tiorredoxina reductasa y se cultiva a 25 °C hasta A600 ~ 0,6, inducida con 1 mmol/l de isopropil-L-tio-pD-galactopiranosido, y luego se cultiva durante la noche a 25 °C. La pasta celular de *E. coli* se resuspende y se agita a 4 °C en 1:10 p/v de tampón de lisis B-PER que contiene inhibidores de proteasa libres de EDTA completos. La mezcla se diluye a continuación con tampón stock 5x hasta una concentración final de 50 mmol/l de Tris HCl, 0,4 mol/l de NaCl, 1 % de Triton-X100, 5 % de glicerol y 10 mmol/l de imidazol (pH 8,9). La muestra se complementa con lisozima, DNasa I y 2  
 50 mmol/l de MgCl2 (Sigma), se agita durante 30 minutos, se ajusta a 4 mmol/l de EDTA, se agita durante 20 minutos y luego se centrifuga para eliminar los restos celulares. La muestra se ajusta a 40 mmol/l de MgCl2 y se agita durante 30 minutos antes de cargarla en una columna Ni-IMAC (GE Healthcare). La columna se lava secuencialmente con 3 a 5 CV de 10 mmol/l de imidazol en 20 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0), 2 a 3 CV de Triton X-100 al 0,5 % v/v en 20 mmol/l de Tris- HCl (pH 8,0), luego con 5 a 10 CV de 70 mmol/l de imidazol en 20 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0). El

APRIL truncado se eluye con un gradiente lineal de 70 a 500 mmol/l de imidazol en 20 mmol/l de Tris-HCl, 5 % de glicerol (pH 8,0). Las fracciones proteicas reunidas se dializan frente a tampón PBS que contiene 50 mmol/l de imidazol, 0,1 mol/L de L-Arg, 5 % de glicerol, 1 mmol/l de EDTA (pH 8,0). La concentración de proteína se determina espectrofotométricamente [ $\epsilon_{280}$  (1 %) = 0,94].

- 5 b) APRIL murino recombinante, truncado, que se usó como herramienta (competidor) para las selecciones de presentación en fago y ELISA se expresó transitoriamente como Fc-fusión monomérica N-terminal en células HEK EBNA. APRIL murina comprendía histidina 106 a leucina 241. Se fusionó N-terminalmente a la bisagra de una IgG1 humana permitiendo la heterodimerización con una porción de Fc de IgG1 humana no fusionada (cadena de
- 10 agujeros) mediante tecnología de knobs-into-holes.

### Ejemplo 1A3. BAFF humano recombinante y truncado

- [0126] El BAFF humano truncado recombinante se produce como se describe en Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983). Brevemente, se clona un fragmento de ADN que codifica los restos 82-285 de BAFF en un vector pBr322 que comprende un marcador His en el extremo N y un sitio de escisión de trombina posterior, creando una fusión con un marcador His del extremo N seguido de un sitio de escisión de trombina. Una cepa de E. coli que comprende el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 se cultiva a una fase semilogarítmica a 37 °C en medio LB con carbenicilina 50 mg/l y luego se enfría a 16 °C antes de la inducción con 1,0 mM IPTG. Las células se recolectan por centrifugación después de 12 h de crecimiento adicional y se almacenan a -80 °C. El sedimento celular se resuspende en Tris 50 mM, pH 8,0 y NaCl 500 mM y se sonica en hielo. Después de la centrifugación, el sobrenadante se carga en una columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen). La columna se lava con Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM y luego se eluye con un gradiente escalonado en el mismo tampón con imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen BAFF se agrupan, se agrega trombina y la muestra se dializa durante la noche frente a Tris 20 mM, pH 8,0 y CaCl<sub>2</sub> 5 mM a 4 °C. La proteína se purifica adicionalmente en una columna monoQ (Pharmacia) y finalmente en una columna de exclusión por tamaño S-200 en Tris 20 mM, NaCl 150 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM.
- 15
- 20
- 25

### Ejemplo 1B. Células recombinantes que expresan BCMA humano en su superficie

- 30 [0127] Se generan células recombinantes que expresan BCMA humano en su superficie ("células HEK293-BCMA") como se describe en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18). Brevemente, se amplifica BCMA humano de longitud completa usando el cebador directo 5-GAATTCAAGCTTGCCACCATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCC-3 (SEQ ID NO: 15) que incluye un sitio de restricción HindIII (negrita, subrayado) y secuencia consenso Kozak y cebador inverso 5-GAATTCTCTAGATTACCTAGCAGAAATTGATTCTCTATCTCCGTAGC-3 (SEQ ID NO: 16) que incluye un codón de 3 paradas y un sitio de restricción XbaI (en negrita, subrayado) usando el clon 687194 de IMAGE (Invitrogen) como una plantilla de PCR. El producto de amplificación se clona en un vector de expresión de E. coli, que comprende potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), una polihistidina (6xHis) y un gen de resistencia a neomicina, linealizado y transfectado en células de riñón embrionario humano 293 (HEK293). Se seleccionan estas células que expresan BCMA humana en sus clones estables de alta expresión en la superficie que se eligen por análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia.
- 35
- 40

### Ejemplo 1C. Línea celular de mieloma humano que expresa BCMA en su superficie

- 45 [0128]
- a) Origen de la célula y condiciones de cultivo. La línea celular MM humana NCI-H929 se adquiere de la American Type Culture Collection (ATCC CRL-9068). Las células NCI-H929 se cultivan en RPMI 1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM. U266B1 (ATCC TIB-196), una línea celular de mieloma de linfocitos B humanos cultivada en RPMI con alto contenido de glucosa, 10 % de FCS, 1 % de glutamina, 1 % de piruvato de sodio, 10 mM de HEPES). RPMI 8226 (ATCC CCL-155), una línea celular de mieloma de linfocito B humano cultivada en DMEM, 10 % de FCS, 1 % de glutamina. MKN45 (DSMZ ACC 409), una línea celular de adenocarcinoma gástrico humano cultivada en DMEM que contiene 10 % de FCS y 1 % de Glutamina. La expresión de BCMA en líneas celulares de MM se confirma por citometría de flujo usando anticuerpos BCMA antihumanos conjugados con fluorocromo (BD Biosciences).
- 50
- 55

- b) La expresión de BCMA se evaluó en tres líneas celulares de mieloma humano (H929, RPMI-8226 y U266B1) mediante citometría de flujo. Brevemente, las células se cosecharon, se lavaron, se contaron para su viabilidad, se



resuspendieron a 50000 células/pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos y se incubaron con anticuerpo anti-humano BCMA (Abcam, #ab54834, IgG1 de ratón) a 10 µg/ml durante 30 min a 4 °C (para evitar la internalización). Se usó IgG1 de ratón como control de isotipo (BD Biosciences, # 554121). Después, las células se centrifugaron (5 min a 350 x g), se lavaron dos veces y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC durante 30 min a 4 °C. Al final del tiempo de incubación, las células se centrifugaron (5 minutos a 350 x g), se lavaron dos veces con tampón FACS, se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS y se analizaron en un dispositivo Cantoll que ejecutaba el software FACS Diva. La Figura 4 muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia media tras la unión de concentraciones crecientes del anticuerpo anti-BCMA a las células H929. La cuantificación del número de receptores de BCMA en la superficie de la membrana de líneas celulares de mieloma H929, RPMI-8226 y U266B1 se evaluó mediante análisis QFIKIT (Dako, n.º K0078, siguiendo las instrucciones del fabricante).

**Tabla 2: Cuantificación del número de receptores de BCMA en la superficie de la membrana de líneas celulares de mieloma H929, RPMI-8226 y U266B1.**

Líneas celulares del mieloma	Nro. de receptor BCMA
H929	6085
RPMI-8226	6253
U266(B1)	2865

#### **Ejemplo 1D. Obtención de anticuerpos anti-BCMA por inmunización**

**[0129]** Los anticuerpos anti-BCMA se generan por inmunización de ratas con BCD ECD como se describe en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18). Brevemente, las ratas Sprague Dawley se inmunizan por vía subcutánea con ECM de BCMA conjugado con hemocianina con lapa californiana (aminoácidos 5-54; NP\_001183) usando el adyuvante TiterMax® (Sigma). La conjugación de hemocianina de lapa con ojo de cerradura se realiza con un residuo de lisina usando Imject mckLHV (Pierce). Debido a la alta homología de secuencia entre las proteínas BCMA humanas y de ratón, se prefieren las ratas para la producción de anticuerpos. Las células B se recogen de bazo inmunizado y se fusionan a células de mieloma P3-X63.Ag8 usando un protocolo de fusión de polietilenglicol estándar (Goding 1996; Monoclonal antibodies: principles and practice, 3rd ed. Academic Press). Los hibridomas se cultivan en 80 % del medio de Dulbecco modificado de Iscove suplementado con 10 % de clon fetal I, 4 mmol/l de L-glutamina, 10 % de factor de clonación y que también incluyen penicilina, estreptomycin y 1x hipoxantina sódica, aminopterina y timidina. La prueba de ELISA se realiza para detectar la unión de sobrenadantes de cultivo de hibridoma a BCMA. Los hibridomas de unión a BCMA positivos se rastrean adicionalmente mediante citometría de flujo para la unión basada en células a transfectantes de BCMA (células HEK293-BCMA). Los hibridomas elegidos se someten a dos rondas de clonación por dilución limitante y se expanden adicionalmente para la purificación. Además, los anticuerpos de esos mismos hibridomas elegidos se convierten en anticuerpos quiméricos con regiones constantes humanas por métodos estándar. Brevemente, los ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera se amplifican por RT-PCR a partir de ARNm de los hibridomas y luego se unen en marco con ADNc que codifican la región constante pesada de IgG1 humana y la región constante de cadena ligera kappa humana, respectivamente. Estos ADNc se clonan en vectores de expresión transitoria de mamífero y el ADN plasmídico se produce en E. coli y se purifica para la transfección. Las células HEK293 se transfectan mediante un método de transfección estándar (transfección basada en fosfato de calcio) y 7 días más tarde se purifican anticuerpos IgG1 a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A seguida de aislamiento de la fracción de anticuerpo monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

#### **Ejemplo 1E. Obtención de anticuerpos anti-BCMA a partir de una biblioteca recombinante in vitro**

##### **45 Ejemplo 1E1. Construcción de genotecas Fab genéricas**

**[0130]** Bibliotecas de anticuerpos genérico en el Fab-formato se construyen sobre la base de genes de la línea germinal humana usando los siguientes pares de dominio V: cadena ligera kappa Vk3\_20 con VH3\_23 de la cadena pesada para la biblioteca DP47-3 y la cadena ligera kappa Vk1\_17 con la cadena pesada VH1\_69 para la biblioteca DP88-3. Ambas bibliotecas se asignaron al azar en CDR3 de la cadena ligera (L3) y CDR3 de la cadena pesada (H3) y se ensamblan a partir de 3 fragmentos por biblioteca mediante corte y empalme por extensión de solapamiento (SOE) PCR. El fragmento 1 comprende el extremo 5' del gen del anticuerpo que incluye L3

aleatorizado, el fragmento 2 es un fragmento constante central que abarca desde L3 a H3, mientras que el fragmento 3 comprende H3 aleatorizado y la porción 3' del gen del anticuerpo. Las siguientes combinaciones de cebadores se utilizan para generar fragmentos de la biblioteca para la biblioteca DP47-3: fragmento 1 (LMB3-LibL1b\_new), fragmento 2 (MS63-MS64), fragmento 3 (Lib2H fdseqlong). Ver la Tabla 1 del documento WO2012020038. Las siguientes combinaciones de cebadores se usan para generar fragmentos de biblioteca para la biblioteca DP88-3: fragmento 1 (LMB3 RJH\_LIB3), fragmento 2 (RJH31-RJH32) y fragmento 3 (LIB88-2-fdseqlong). Ver tablas 3 y 4 del documento WO2012020038.

**[0131]** El protocolo de PCR para la producción de fragmentos de biblioteca incluye: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C; 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C y 1 minuto a 72 °C; y elongación terminal durante 10 minutos a 72 °C. Para la PCR de ensamblaje, se usan proporciones equimolares de los 3 fragmentos como plantilla. El protocolo de PCR de ensamblaje incluye: 3 min de desnaturalización inicial a 94 °C; y 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 58 °C y 2 minutos a 72 °C. En esta etapa, se añaden los cebadores complementarios a la secuencia fuera de los fragmentos 1-3 y se realizan 20 ciclos adicionales antes de un alargamiento terminal durante 10 minutos a 72 °C. Después del montaje de cantidades suficientes de longitud completa de construcciones Fab aleatorizadas, las construcciones Fab se digieren con NcoI/NotI para la biblioteca DP47-3 y con NcoI/NheI para la biblioteca DP88-3 junto con un vector fagémido aceptor tratador de manera similar. Para la biblioteca DP47-3, se ligan 22,8 µg de la biblioteca Fab con 16,2 µg de vector fagémido. Para la biblioteca DP88-3, 30,6 µg de la biblioteca Fab se ligan con 30,6 µg de vector fagémido.

**[0132]** Las ligaciones purificadas se usan para 68 transformaciones para la biblioteca DP47-3 y 64 transformaciones para la biblioteca DP88-3, respectivamente, para obtener bibliotecas finales DP47-3 y DP88-3. Las partículas de fagémidos se reproducen. Las bibliotecas de Fab se rescatan y se purifican por purificación de PEG/NaCl para usar para la selección de clones de Fab anti-BCMA.

#### **Ejemplo 1E2. Selección de clones Fab anti-BCMA**

##### **[0133]**

a) Las selecciones se llevan a cabo contra BCMA-ECD-biot. El antígeno se biotinila in vivo tras la expresión. Las selecciones se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente protocolo: (i) la unión de  $10^{12}$  partículas de fagémido de la biblioteca DP88-3 y 100 nM BCMA-ECD-biot durante 0,5 horas en un volumen total de 1 ml; (ii) captura de biot de BCMA-ECD y fago unido mediante la adición de  $5,4 \times 10^7$  perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina durante 10 min; (iii) lavado de perlas usando 5x1 ml de PBS/Tween®20 y 5x1 ml de PBS; (iv) elución de partículas de fago mediante la adición de 1 ml de TEA 100 mM (triethylamina) durante 10 minutos y neutralización mediante la adición de 500 µl de Tris/HCl 1 M, pH 7,4; y (v) re-infección de células TG1 de E. coli en fase logarítmica (Zymo Research), infección con el fago auxiliar VCSM13 (Stratagene) y posterior precipitación de PEG/NaCl de partículas de fagémidos para usar en rondas de selección posteriores.

Las selecciones se llevan a cabo en 3 rondas usando concentraciones constantes de BCMA-ECD-biot a 100 nM. En la ronda 2, la captura de complejos de antígeno: fago se realiza en placas de neutravidina en lugar de perlas de estreptavidina. Los ligandos específicos se identifican mediante ELISA de la siguiente manera usando: 100 µl de BCMA-ECD-biot 100 nM que recubren cada pocillo de placas de neutravidina. Se añaden los sobrenadantes bacterianos que contienen Fab y se detectan los Fabs de unión a través de sus marcadores Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Una vez identificados, los clones de ECD anti-BCMA se expresan bacterianamente en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purifican por afinidad y se caracterizan adicionalmente por análisis SPR usando un instrumento BIACORE®.

b) Los Fab anti-BCMA se establecieron mediante visualización en fagos a partir de bibliotecas de Fab sintéticas que consisten en emparejamientos de VL y VH derivados de diferentes familias de dominios en V. Clones 13C2, 17A5, 83A10, 13D2, 14B11, 14e1, 29B11, y 29F3 se generaron a partir de la sub-biblioteca Vk3\_20/VH3\_23, clon 13A4 de sub-biblioteca Vk2D\_28/VH5\_1, y el clon 13A7 de sub-biblioteca Vk2D\_28/VH3\_23, respectivamente (Tabla 3). Estas bibliotecas se basan en estructuras totalmente humanas con diversidad de secuencias en CDR3 de VL (3 longitudes diferentes) y dominios de VH (6 longitudes diferentes).

**Tabla 3: clones anti-BCMA y respectivos pares VL/VH**

Clon Fab	Dominio VL	Dominio VH
13C2	Vk3_20	VH3_23
17A5	Vk3_20	VH3_23

83A10	Vk3_20	VH3_23
13A4	Vk2D_28	VH5_1
13D2	Vk3_20	VH3_23
14B11	Vk3_20	VH3_23
14E1	Vk3_20	VH3_23
29B11	Vk3_20	VH3_23
29F3	Vk3_20	VH3_23
13A7	Vk2D_28	VH3_23

**[0134]** Se realizaron rondas de selección (biopanning) en solución de acuerdo con el siguiente patrón: 1. eliminación previa de  $\sim 10^{12}$  partículas de fagémidos por grupo de bibliotecas en inmunotubos recubiertos con 10  $\mu\text{g/ml}$  de una IgG humana no relacionada para reducir las bibliotecas de anticuerpos que reconocen la porción Fc de los antígenos, 2. incubación de las partículas de fagémidos que no se unen a Fc con BCMA biotinilado 100 nM durante 0,5 h en presencia de péptidos Fc no biotinilados no biológicos de 100 nM en construcción de agujeros para una mayor reducción de los aglutinantes Fc en un volumen total de 2 ml, 3. captura de BCMA biotinilado y unión específicamente a fagos mediante la división y transferencia de la reacción de panning en 16 pocillos en una placa de microtitulación pretratada con neutravidina o estreptavidina durante 20 min en un agitador, 4. lavado de los pocillos respectivos 10-30x con PBS/Tween20 y 10-30x con PBS usando un lavador de placas, 5. paso de lavado competitivo opcional por adición de APRIL murino 230 nM para desplazar a los clones Fab que reconocen el sitio de unión del ligando natural, por lo que de esta manera selecciona anticuerpos anti-fago APRIL no competitivos, 6. elución de partículas de fago mediante la adición de 125  $\mu\text{l}$  de TEA 100 mM (trietilamina) por pocillo durante 5-10 min y neutralización mediante la adición de un volumen igual de Tris/HCl 1M, pH 7,4, 7. Reinfección de células de E. coli TG1 de fase logarítmica con las partículas de fagos eluidas, infección con helperfago VCSM13, incubación en un agitador a 30 °C durante la noche y posterior precipitación de PEG/NaCl de partículas de fagémidos para su uso en la siguiente ronda de selección.

**[0135]** Las selecciones se llevaron a cabo durante 3 a 5 rondas usando concentraciones constantes de antígeno de 100 nM. Además de las campañas de selección durante las cuales solo se utilizó BCMA humano como antígeno, se llevaron a cabo campañas de selección adicionales durante las cuales también se usaron BCMA de macaco o murino de forma alterna con BCMA humana para seleccionar anticuerpos con reactividad cruzada. Además, como alternativa a la captura basada en la placa de estreptavidina, se realizó la captura de los complejos antígeno:fago mediante la adición de  $5,4 \times 10^7$  perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina a la reacción de selección seguida por etapas de lavado usando respectivos imanes en las condiciones descritas anteriormente.

**[0136]** Se identificaron aglutinantes específicos mediante selección de resonancia de plasmón superficial de sobrenadantes de cultivo bacteriano que contenían Fab usando el biosensor ProteOn XPR36 de BioRad. En resumen, después de la infección de células TG1 de E. coli en fase logarítmica con las partículas del fago eluidas, se sembraron en placas unidades individuales formadoras de colonias (UFC) para la inoculación de 1 ml de cultivos de expresión en placas de 96 pocillos profundos. Los Fab se capturaron de los sobrenadantes en un chip ProteOn GLM que se derivatizó con 8,000 - 10.000 RU de anticuerpo IgG anti-humano de cabra, fragmento F(ab')<sub>2</sub> específico (Jackson ImmunoResearch, # 109-005-006) en orientación vertical. Posteriormente, se inyectaron BCMA humano, de macaco y murino, así como una construcción knobs-into-holes Fc no relacionada como analitos en orientación horizontal. Los clones que exhibieron respuestas de unión significativas a BCMA y no se unieron a la porción Fc de los antígenos, se expresaron bacterianamente en un volumen de cultivo de 0,5 litros, se purificaron por afinidad y se caracterizaron cinéticamente por análisis SPR usando un protocolo de cinética de dosis única en ProteOn de BioRad Biosensor XPR36.

#### 40 Ejemplo 1F. Ensayos de unión BCMA: resonancia de plasmón superficial

##### **[0137]**

a) Para medir las afinidades de unión de anticuerpo BCMA a BCMA inmovilizado, se realizan mediciones de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore® 3000 (Pharmacia Biosensor). El receptor BCMA (BCMA-ECD) está acoplado al chip sensor a un nivel de 400 unidades de resonancia usando el protocolo de

- acoplamiento de amina proporcionado por el fabricante. El BCMA-ECD-biot alternativo está acoplado a un chip con sensor de estreptavidina, también a un nivel de 400 unidades de resonancia, utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. En todos los experimentos, la celda de flujo 1 se usa como celda de referencia. Los sensogramas se registran para soluciones Fab que varían en una concentración de 0,1 pM a 200 nM. El análisis de regresión no lineal se usa para calcular constantes cinéticas y constantes de unión simultáneamente con el uso del software del fabricante. Los clones Fab con afinidades de unión monovalentes a BCMA-ECD de  $\leq 100$  nM se convierten en IgG por métodos estándar. Brevemente, los ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen en marco con ADNc que codifican la región constante pesada de IgG1 humana y la región constante de cadena ligera kappa humana, respectivamente. Estos ADNc se clonan en vectores de expresión transitoria de mamífero y el ADN plasmídico se produce en *E. coli* y se purifica para la transfección. Las células HEK293 se transfectan mediante un método de transfección estándar (transfección basada en fosfato de calcio) y 7 días más tarde se purifican anticuerpos IgG1 a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína A seguida de aislamiento de la fracción de anticuerpo monomérico mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
- b) Se midieron las afinidades ( $K_D$ ) de clones Fab anti-BCMA mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con BCMA humano, de macaco y murino biotinilado inmovilizado en chips de NLC mediante captura de neutravidina (Tabla 4). Se inmovilizó una construcción de knobs-into-holes de Fc biotinilada no relacionada en una forma similar a la del control negativo. Inmovilización de antígenos (ligando): antígenos recombinantes se diluyeron con PBST (fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 7,4, Tween 20 al 0,005 %) a 10 µg/ml, luego se inyectaron a 40 µl/minuto durante 300 s en orientación vertical. Inyección de analitos: para las mediciones de cinética de una sola toma, la dirección de inyección se cambió a orientación horizontal, se inyectaron simultáneamente series de dilución doble de Fab purificado (intervalos de concentración variables) a 40 µl/min a lo largo de los canales 1-5, con tiempos de asociación de 200 o 300s, y tiempos de disociación de 300s. Se inyectó un tampón (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un espacio en blanco "en línea" para hacer de referencia. Las constantes de velocidad de asociación ( $k_{on}$ ) y las constantes de velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) se calcularon usando un modelo simple de unión de Langmuir de una a una en el software ProteOn Manager v3.1 ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) se calculó como la relación  $k_{off}/k_{on}$ . La regeneración se realizó en orientación horizontal usando 10 mM de glicina-HCl pH 1,5 a un caudal de 100 µl/min para un tiempo de contacto de 18 s.

**Tabla 4: Afinidades monovalentes de clones Fab anti-BCMA:**

Clon Fab	$K_D$ humano BCMA [nM]	$K_D$ de macaco BCMA [nM]	$K_D$ murino BCMA [nM]
13C2	196	-	144
17A5	45	-	74
83A10	76	1510	1130
13A4	1,8	-	-
13D2	86	débil	débil
14B11	383	-	-
14E1	91	débil	débil
29B11	224	-	débil
29F3	87	-	débil
13A7	235	-	-

- c) Evaluación de la unión de anticuerpos anti-BCMA a BCMA recombinante por resonancia de plasmón superficial (SPR) de la siguiente manera. Todos los experimentos SPR se realizaron en un Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo 0,005 % P20, Biacore, Freiburg/Alemania). Se determinó la avidez de la interacción entre anticuerpos anti-BCMA y BCMA Fc recombinante (kih) (humano, de macaco y murino). El BCMA Fc (kih) recombinante biotinilado humano, de macaco y murino se acopló directamente en un chip SA siguiendo las instrucciones (Biacore, Freiburg/Alemania). El nivel de inmovilización varió de 200 a 700 RU. Los anticuerpos anti-BCMA se pasaron a un intervalo de concentración de 2

veces (1,95 a 500 nM) con un flujo de 30  $\mu$ l/minuto a través de las células de flujo durante 120 segundos. La disociación se controló durante 180 segundos. Las diferencias del índice de refracción masivo se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Aquí, los anticuerpos anti-BCMA se hicieron volar sobre una superficie vacía previamente activada y desactivada como se describe en el kit de acoplamiento de amina estándar. Las constantes cinéticas aparentes se derivaron utilizando el software de evaluación Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica, a pesar de la bivalencia de la interacción para propósitos de comparación.

- [0138]** También se determinó la afinidad de la interacción entre anticuerpos anti-BCMA y BCMA Fc humano recombinante (kih). El anticuerpo Fab antihumano (GE Healthcare) se acopló directamente en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Freiburg/Alemania). El nivel de inmovilización fue de aproximadamente 6500 RU. El anticuerpo anti-BCMA fue capturado durante 90 segundos a 25 nM. Se transfirió BCMA Fc humano recombinante (kih) a un intervalo de concentración de 4 veces (1,95 a 500 nM) con un flujo de 30  $\mu$ l/minuto a través de las células de flujo durante 120 segundos. La disociación se controló durante 120 segundos. Las diferencias del índice de refracción masivo se corrigieron restando la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Aquí, se hizo volar BCMA recombinante sobre una superficie con anticuerpo Fab antihumano inmovilizado, pero sobre el cual se había inyectado HBS-EP en lugar de anticuerpo anti-BCMA. Las constantes cinéticas se obtuvieron usando el software de evaluación Biacore T100 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica (Tabla 5). También se midió la unión de 83A10 anticuerpo anti-BCMA a BCMA Fc (kih) recombinante de macaco y BCMA Fc (kih) murino (Tabla 6).

**Tabla 5. Constantes de afinidad determinadas por las ecuaciones de velocidad de ajuste para la unión Langmuir 1:1**

Ligando	Analito	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
13C2 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	2,4E+05	1,1E-02	4,7E-08
17A5 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	22E+05	1,9E-03	8,7E-09
83A10 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	62E+05	2,5E-03	4,1E-09
29F3 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	3,2E+05	6,8E-03	2,1E-08
13A7 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	8,0E+04	7,9E-03	1,0E-07
13A4 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	7,2E+04	3,6E-04	5,1E-09
13D2 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	3,6E+05	9,3E-03	2,6E-08
14B11 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	1,5E+05	1,6E-02	1,1E-07
14E1 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	4,0E+05	8.1E-03	2.0E-08
29B11 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	1,7E+05	6.6E-03	4.0E-08

**Tabla 6: Unión de BCMA recombinante Fc (kih) a anticuerpo anti-BCMA 83A10. a) BCMA Fc (kih) de macaco. b) BCMA Fc (kih) murino**

Ligando	Analito	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
83A10 anti-BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	6,2E+05	2,5E-03	4,1E-09
83A10 anti-BCMA IgG	cyBCMA Fc(kih)	2,8E+05	2,0E-02	7,2E-08
83A10 anti-BCMA IgG	muBCMA Fc(kih)	2,0E+05	4,0E-02	2,0E-07

#### **Ejemplo 1G. Ensayo de señalización BCMA: activación de NF- $\kappa$ B**

##### **[0139]**

a) Como se describe en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18), las células NCI-H929 se lavan e incuban en RPMI suplementado con suero bovino fetal al 0,25 % durante 24 h antes del tratamiento. A continuación, las células

no se tratan o se tratan con 0,1 µg/ml de TNF-α, 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL truncado HT tratado con calor, 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL truncado, de 0,1 pM a 200 nM de control de isotipo, o de 0,1 pM a 200 nM de anticuerpos anti-BCMA durante 20 min. Para evaluar el bloqueo de ligandos, las células pretratadas durante 20 minutos con 0,1 pM a 200 nM de anticuerpos anti-BCMA o un anticuerpo de control de isotipo se tratan con 1 µg/ml de APRIL truncado. Las células se cosechan, lavan y lisan con 50 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5), 1 % de NP40, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA, 1 mmol/l de EGTA suplementado con proteasa e inhibidores de la fosfatasa. Los extractos de proteínas se analizan luego para la actividad de NF-κB usando un kit de ensayo quimioluminiscente TransAM® (Active Motif) y la lectura de la señal luminiscente se realiza con un lector de placas Fusion HT (Packard Instruments).

b) En resumen, las células H929 se privaron de alimento en RPMI1640 con 0,25 % de FCS durante 24 horas a 37 °C en una incubadora de células. Al final del tiempo de inanición, las células se cosecharon, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. Las células viables se ajustaron a 4 x 10<sup>6</sup> células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 30 ml de esta suspensión celular se alicuotaron adicionalmente por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se preincubaron con anticuerpos anti-BCMA (15 o 50 µg/ml) o anticuerpos de control de isotipo (10, 20 y 40 µg/ml) durante 20 minutos en una incubadora de células. Después, las células se suplementaron con 1 µg/ml de Δ-APRIL de ratón recombinante marcado con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, n.º 7907-AP-010) durante 40 min a 37 °C. Se usó Δ-APRIL (HI APRIL) inactivado por calor en el ensayo para confirmar la especificidad de la señal de NFκB inducida por Δ-APRIL (la inactivación por calor se realizó por tratamiento de Δ-APRIL a 60 °C durante 1 h). Al final del tiempo de incubación, las células se cosecharon, se lavaron, se lisaron y se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante del Nuclear Extract Kit (Active Motif, n.º 40410). Los extractos de proteínas se analizaron para la actividad de NF-κB usando un kit de ensayo TransAm © NFκB p65 Chemo (Active Motif, n.º 40097) siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal luminiscente se leyó utilizando el luminómetro Spectra Max M5 (Molecular Devices).

**Ejemplo 1H. Detección de anticuerpos anti-BCMA para seleccionar anticuerpos no afectados por 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL o BAFF en su unión a BCMA y que ni promueven ni bloquean la señalización a través del dominio intracelular de BCMA**

[0140] La descripción se refiere a la generación de un anticuerpo BCMA antihumano que 1) se une a BCMA humano, 2) la unión a BCMA no se ve afectada por 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL y BAFF, 3) no bloquea ni reduce > 20 %, preferiblemente > 15 % o aumenta > 20 %, preferiblemente > 15 % de activación de NF-κB dependiente de APRIL, 4) no bloquea ni reduce > 20 %, preferiblemente > 15 % o aumenta > 20 %, preferiblemente > 15% de activación de NF-κB dependiente de BAFF, 5) no induce la activación de NF-κB por sí misma, sin APRIL o BAFF. La Tabla 10 muestra el paradigma de selección para la selección de un anticuerpo BCMA con nuevas propiedades deseadas: unión no ligando/bloqueante, competencia no ligando. Se seleccionan anticuerpos cuya unión a BCMA no está bloqueada por APRIL o por BAFF.

**Ejemplo 1H1. Unión a BCMA en células HEK293-BCMA, líneas celulares de mieloma múltiple BCMA positivas o BCMA unido a placa (citometría de flujo y ELISA)**

[0141]

a) Los anticuerpos anti-BCMA procedentes del procedimiento de inmunización y/o del cribado de la biblioteca recombinante in vitro descritos anteriormente se analizan mediante citometría de flujo para la unión a BCMA humano en células HEK293-BCMA. Brevemente, las células cultivadas se recogen, se cuentan y la viabilidad celular se evalúa usando el procedimiento de exclusión con azul de tripano. Las células viables se ajustan luego a 2 x 10<sup>6</sup> células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotan adicionalmente 90 ml de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añaden 10 µl de los anticuerpos anti-BCMA o el correspondiente control de IgG a los pocillos que contienen células para obtener concentraciones finales de 0,1 pM a 200 nM. Todas las construcciones y la IgG de control se usan con la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 min a 4 °C, las células se centrifugan (5 min, 350 x g), se lavan con 150 µl/pocillo de FACS Stain Buffer (BD Biosciences), se resuspenden y se incuban durante 30 min adicionales a 4 °C con 12 µl/pocillo de AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> conjugado con Fcγ fragmento específico de IgG antihumano de cabra (Jackson Immuno Research Lab; disolución de trabajo: 1:20). Después, las células se lavan con Stain Buffer (BD Biosciences) 120 µl/pocillo y se sedimentan por centrifugación a 350 x g durante 5 minutos. Se realiza una segunda etapa de lavado usando FACS Stain Buffer 150 µl/pocillo. Las muestras se resuspenden en tampón de tinción FACS a 200 µl/pocillo y se adquieren y analizan usando un citómetro de flujo LSR II con el software FACSDiva® (BD Biosciences). La intensidad de fluorescencia media (MFI) se representa en función de la concentración de

anticuerpo anti-BCMA para obtener la curva de unión y calcular la concentración efectiva de anticuerpo para alcanzar el 50 % de la unión máxima ( $EC_{50}$ ). Los anticuerpos anti-BCMA que se unen a BCMA en las células a juzgar por este ensayo se seleccionan para la siguiente etapa de selección, llamado el ensayo de unión de BCMA en competición contra APRIL y BAFF (paso (Ejemplo 1H2) a continuación).

5

Las propiedades de los anticuerpos que muestran la unión a BCMA humano en células HEK293-BCMA se confirman usando un método ELISA como se describe por Ryan et al. (2007). Brevemente, las placas de 96 pocillos inmunosorb se recubren con 1,5 µg/ml de GST-BCMAECD, se lavan con PBS + 1 % de Tween (PBS-T) y se bloquean con PBS-T más 1 % de albúmina de suero. Las placas recubiertas con BCMA se incuban con sobrenadantes de cultivo de hibridoma durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavan 5 veces con PBS-T y se incuban con IgG de cabra anti-rata conjugada con peroxidasa. Después de la incubación con anticuerpo secundario, las placas se lavan, se incuban con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y se detienen con un volumen igual de 1 mol/l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. b) Anticuerpos anti-BCMA IgG (clones 13C2, 17A5, 83A10, 13A4, 13D2, 14E1, 13A7, 14B11) se analizaron mediante citometría de flujo para la unión a BCMA humana en células H929 que expresaban BCMA. MKN45 (línea celular de adenocarcinoma gástrico humano que no expresa BCMA) se usó como control negativo. Brevemente, las células cultivadas se recogen, se cuentan y se evalúa la viabilidad celular usando ViCell. Las células viables se ajustan luego a  $2 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron adicionalmente 100 µl de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 30 µl de los anticuerpos anti-BCMA o control de IgG correspondiente durante 30 min a 4 °C. Todos los anticuerpos anti-BCMA (y control de isotipo) se titularon y se analizaron en un intervalo de concentración final entre 0,1 - 40 µg/ml. Luego las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120 µl/pocillo de FACS Stain Buffer (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4 °C con Fragmento de IgG Fc de antihumano cabra fragmento específico AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> conjugado con fluorocromo conjugado con PE (Jackson Immuno Research Lab; 109 116-170). Las células se lavaron dos veces con tampón de tinción (BD Biosciences), se fijaron usando 100 µl de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 120 ml de tampón FACS y se analizaron usando BD FACS Cantoll. La Figura 5 muestra la intensidad de fluorescencia media para los clones de IgG anti-BCMA representados en función de la concentración de anticuerpo anti-BCMA; (A) clones 13C2, 17A5, 83A10 en células H929, (B) clones 13C2, 17A5, 83A10 en células MKN45, (C) clones 13A4, 13D2, 14E1, 13A7, 14B11 en células H929 (D) clones 13A4, 13D2, 14E1, 13A7, 14B11 en células MKN45. Los valores de  $EC_{50}$  (que indican la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar el 50 % de la unión máxima) para la unión de clones 13C2, 17A5, 83A10 a células H929 se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 7: valores de  $EC_{50}$  para la unión de anticuerpos anti-BCMA a células de mieloma múltiple H929**

	Clon anticuerpo anti-BCMA 13C2	Clon anticuerpo anti-BCMA 83A10	Clon anticuerpo anti-BCMA 17A5
<b><math>EC_{50}</math> (nM)</b>	13,9	12,5	9,0
<b><math>EC_{50}</math> (ug/ml)</b>	2,0	1,8	1,3

35

**Ejemplo 1H2. 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL o BAFF no altera la unión del anticuerpo BCMA a BCMA humano (citometría de flujo y ELISA)**

[0142]

40

a) Los anticuerpos anti-BCMA seleccionados de la etapa (Ejemplo 1H1) anterior se analizan luego mediante citometría de flujo para unirse a BCMA humano en células HEK293-BCMA en presencia y ausencia de 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL o BAFF. Las células HEK293-BCMA viables se ajustan a  $2 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotan adicionalmente 90 ml de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añaden 10 µl de los anticuerpos anti-BCMA o el correspondiente control de IgG a los pocillos que contienen células para obtener concentraciones finales de 0,1 pM a 200 nM. Todas las construcciones y la IgG de control se usan con la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 minutos a 37 °C, en presencia y ausencia de 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL y BAFF, respectivamente, las células se centrifugan (5 min, 350 x g), se lavan con 150 µl/pocillo de FACS Stain Buffer (BD Biosciences), resuspendido e incubado durante 30 min adicionales a 4 °C con 12 µl/pocillo de Fragmento de IgG Fc de antihumano cabra fragmento específico AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> conjugado con fluorocromo

50

conjugado con PE (Jackson Immuno Research Lab solución de trabajo: 1:20). Después, las células se lavan con Stain Buffer (BD Biosciences) 120 µl/pocillo y se sedimentan por centrifugación a 350 x g durante 5 minutos. Se realiza una segunda etapa de lavado usando FACS Stain Buffer 150 µl/pocillo. Las muestras se resuspenden en tampón de tinción FACS a 200 µl/pocillo y se adquieren y analizan usando un citómetro de flujo LSR II con el software FACSDiva® (BD Biosciences). La intensidad de fluorescencia media se representa en función de la concentración de anticuerpo anti-BCMA para obtener la curva de unión y calcular la concentración de anticuerpo eficaz para alcanzar el 50 % de la unión máxima ( $EC_{50}$ ). Una curva de unión se realiza en presencia de APRIL, otra en su ausencia, y lo mismo se hace para presencia y ausencia de BAFF. Aquellos anticuerpos cuya unión a BCMA no se ve afectada por 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL y tampoco se ven afectados por 100 ng / ml, preferiblemente 1000 ng/ml de BAFF, se seleccionan para los siguientes pasos a continuación. Curvas de unión representativas para anticuerpos que no compiten con los ligandos APRIL y BAFF para unirse a BCMA y para anticuerpos que compiten con estos ligandos para unirse a BCMA se muestran en la Figura 1.

Las propiedades de anticuerpos que muestran unión a BCMA humano en células HEK293-BCMA en presencia de 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL o BAFF se confirman usando un método de ELISA como se describe por Ryan et al. (2007). Brevemente, las placas de 96 pocillos inmunosorb están recubiertas con 1,5 ng/ml de GST-BCMA-ECD, se lavan con PBS + Tween® al 1 % (PBS-T) y se bloquean con PBS-T más albúmina sérica al 1 %. Las placas recubiertas con BCMA se incuban con sobrenadantes de cultivo de hibridoma durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavan 5 veces con PBS-T y se incuban con IgG de cabra anti-rata conjugada con peroxidasa. Después de la incubación con anticuerpo secundario, las placas se lavan, se incuban con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y se detienen con un volumen igual de 1 mol/l de  $H_2SO_4$ . Para el bloqueo de ligandos basado en placa, las placas se recubren con 1 µg/ml de GST-BCMA-ECD como se describió anteriormente. Las placas recubiertas se preincuban con anticuerpos purificados a las concentraciones especificadas, se lavan con PBS-T y luego se incuban con 3 µg/ml de MegaAPRIL humano recombinante (Alexis Biochemicals) o BAFF humano recombinante (R & D Systems). La unión de APRIL o BAFF se detecta usando anti-FLAG conjugado con peroxidasa seguido del desarrollo con 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina como se describió anteriormente.

b) Identificación de Fabs anti-BCMA competitivos que no son de APRIL o anticuerpos mediante ELISA. La unión de Fab a BCMA humano inmovilizado se evaluó en presencia de concentraciones crecientes de APRIL murino. Se recubrió BCN humano biotinilada 25 nM (100 µl/pocillo) en una placa de neutravidina y se incubaron en un agitador durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadieron Fab purificados a 500 nM o 1000 nM para saturar el BCMA humano recubierto durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBS y se añadió APRIL murino a ocho concentraciones diferentes usando una serie de dilución doble en tampón PBS, que variaba de 0 a 100 nM, y se incubó en un agitador durante 30 min. La placa se lavó 3 veces con PBS y se añadió anticuerpo secundario anti-FLAG-HRP (1:4000) durante 1 h. De nuevo, la placa se lavó 3 veces con PBS y se desarrolló añadiendo 100 µl/pocillo de BM Blue POD (Roche). La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl/pocillo de  $H_2SO_4$  1M y la OD se leyó a 450 nm (referencia a 650 nm) para una lectura final de  $OD_{450-650}$ . Los resultados para Fab seleccionados se muestran en la Figura 6. La reducción (%) de los valores OD medidos con los clones anti-BCMA en ausencia frente a la presencia de 50 µM (1000 ng/ml) o 6,25 nM (140 ng/ml) de muAPRIL (APRIL murino) se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8: Reducción en los valores de OD medidos (450 nm) en ausencia comparados con los medidos en presencia de muAPRIL**

muAPRIL (nM y ng/mL)	Reducción (%) en valores OD en presencia de muAPRIL						
	Clones anticuerpos anti-BCMA						
	13C2	17A5	83A10	13A4	13D2	29B11	13A7
50 nM / 1000 ng/mL	18,9%	34,5%	6,3%	13,1%	7,3%	67,3%	93,2%
6,25 nM / 140 ng/mL	no ↓	5,6%	no ↓	7,7%	6,4%	12,1%	31,3%

c) Competencia de Δ-APRIL con anticuerpos anti-BCMA detectados por citometría de flujo. La evaluación de la competencia final entre Δ-APRIL y anticuerpos anti-BCMA se realizó en células H929 mediante la cuantificación de la unión de A-APRIL en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos anti-BCMA (clones 13C2, 17A5, 83A10, 13A4, 13D2, 14E1, 13A7, 14B11). Brevemente, las células cultivadas se recogieron, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 100 µl de esta suspensión celular se alicuotan adicionalmente por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incuban con 30 µl de los anticuerpos anti-BCMA o el control de



- IgG correspondiente durante 30 min a 4 °C. Todos los anticuerpos anti-BCMA (y control de isotipo) se titulan y analizan a concentraciones finales de 1, 16 y 40 µg/ml. Las células se centrifugan (5 min, 350 x g), se lavan con 120 µl/pocillo FACS Stain Buffer (BD Biosciences), se resuspenden y se incuban con 1 µg/ml de Δ-APRIL recombinante de ratón marcado con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, # 7907-AP-010) durante 30 min adicionales a 4 °C. Después, las células se lavan una vez con 120 µl/pocillo de tampón FACS y se incuban con anticuerpo anti-HA conjugado con FITC (Sigma Aldrich, n.º H7411) durante 30 min a 4 °C. Al final del tiempo de incubación, las células se lavan con 120 µl/pocillo de tampón FACS, se fijan usando 100 µl de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspenden en 80 ml de tampón FACS y se analizan utilizando BD FACS Fortessa. La Figura 7 muestra la intensidad relativa de fluorescencia media de A-APRIL (señal de FITC) detectada en función de concentraciones crecientes de clones de anticuerpos anti-BCMA 13A4, 13D2, 14E1, 13A7, 14B11 en células H929. La intensidad media de fluorescencia tras la unión de A-APRIL en presencia del control de isotipo se estableció en uno; las otras señales fueron normalizadas.
- d) Competencia de anticuerpos anti-BCMA con A-APRIL detectada por citometría de flujo. La evaluación de la competencia final entre A-APRIL y anticuerpos anti-BCMA se realizó en células RPMI mediante la cuantificación de la unión de anticuerpos anti-BCMA (clones 13A4, 13C2, 13D2, 14B11, 17A5, 83A10,) en presencia o ausencia de A-APRIL. Brevemente, las células cultivadas se recogieron, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron adicionalmente 100 µl de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 30 µl de los anticuerpos anti-BCMA o control de IgG correspondiente durante 20 min a 4 °C. Todos los anticuerpos anti-BCMA y el control de isotipo se analizaron a concentraciones finales de 40 µg/ml. Las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120 µl/pocillo de FACS Stain Buffer (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron con 1 µg/ml de ratón recombinante A-APRIL marcado con hemaglutinina (HA) (R & D Systems Europe, # 7907-AP-010) durante 40 min adicionales a 4 °C. Después, las células se lavaron una vez con 120 µl/pocillo de tampón FACS y se incubaron con anticuerpo Fc antihumano conjugado con Alexa.Fluor 647 (Jackson Immuno Research Lab, n.º 109-606-008) durante 30 min a 4 °C. Al final del tiempo de incubación, las células se lavaron con 120 µl/pocillo de tampón FACS, se fijaron usando 100 µl de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 80 µl de tampón FACS y se analizaron utilizando BD FACS Fortessa. La Figura 8 muestra la intensidad relativa de fluorescencia media de los clones 13A4, 13C7, 13D2, 14B11, 17A5, 83A10 del anticuerpo anti-BCMA (señal Alexa.Fluor 647) en células RPMI detectadas en ausencia o presencia de 1000 ng/ml de A-APRIL. La mediana de la intensidad de fluorescencia tras la unión de anticuerpos anti-BCMA en ausencia de A-APRIL se estableció en uno; las otras señales respectivas al anticuerpo anti-BCMA en presencia de A-APRIL se normalizaron a la misma.
- e) Competencia de anticuerpos anti-BCMA con A-APRIL después de la incubación simultánea detectada por citometría de flujo. La evaluación de la competencia final entre A-APRIL y anticuerpos anti-BCMA se realizó en células H292 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) mediante la cuantificación de la unión de anticuerpos anti-BCMA (clones 14B11, 13D2, 13A4, 17A5, 83A10) en presencia o ausencia de A-APRIL. Brevemente, las células cultivadas se recogieron, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 100 ml de esta suspensión celular se alicuotó adicionalmente por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 30 µl de anticuerpos anti-BCMA o control de IgG correspondiente y 30 µl de A-APRIL marcados con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, # 7907-AP-010) durante 40 min a 4 °C. Todos los anticuerpos anti-BCMA y el control de isotipo se analizaron a concentraciones finales de 20 µg/ml; Δ-APRIL a concentraciones finales de 2,5 µg/ml. Luego las células se centrifugaron (5 min, 350 x g) y se lavaron con 120 µl/pocillo de FACS Stain Buffer (BD Biosciences). Después de eso, las células se incubaron con anticuerpo Fc antihumano conjugado Alexa.Fluor 647 (Jackson Immuno Research Lab, # 109-606-008) y anticuerpo anti-HA conjugado con FITC (Sigma Aldrich, # H7411) durante 30 min a 4 °C. Al final del tiempo de incubación, las células se lavaron con 120 µl/pocillo de tampón FACS, se fijaron usando 100 µl de tampón de fijación BD por pocillo (#BD Biosciences, 554655) a 4 °C durante 20 min, se resuspendieron en 80 µl de tampón FACS y se analizaron utilizando BD FACS Cantoll. La Figura 9A muestra la intensidad de fluorescencia media y la señal de fluorescencia relativa del clon de anticuerpo anti-BCMA (señal Alexa.Fluor 647) y la Figura 9B muestra la intensidad de fluorescencia media y la señal de fluorescencia relativa de Δ-APRIL (señal FITC) y el Clon de anticuerpo BCMA (señal Alexa.Fluor 647). La detección del anticuerpo anti-BCMA en presencia de Δ-APRIL con anticuerpo Fc antihumano conjugado con FITC se normalizó a la señal del clon de anticuerpo anti-BCMA en ausencia de Δ-APRIL. La detección de Δ-APRIL en presencia del clon de anticuerpo anti-BCMA con anticuerpo anti-HA conjugado con Alexa.Fluor 647 se normalizó a la señal Δ-APRIL en presencia del control de isotipo. La reducción en la unión de anticuerpos anti-BCMA (20 µg/ml) a los clones 14B11, 13D2, 13A4, 17A5 y 83A10 en presencia de Δ-APRIL (2,5 µg/ml) detectada con anticuerpo Fc antihumano conjugado con fluorocromo se resume en Tabla 9.

**Tabla 9: Reducción en la unión de anticuerpos anti-BCMA a células H929 en presencia de APRIL**

Clones anticuerpos anti-BCMA	Reducción (↓) de la unión de anticuerpos anti-BCMA en presencia de APRIL
14B11	50%
13D2	25%
13A4	25%
17A5	20%
83A10	10%

**Ejemplo 1H3. El anticuerpo BCMA no bloquea ni aumenta la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de APRIL**

5

**[0143]**

a) Anticuerpos seleccionados como no competitivos en el paso (Ejemplo 1H2) anterior (es decir, su curva de unión a BCMA no se ve afectada por la presencia de 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL y tampoco se ve afectada por la presencia de 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de BAFF) se prueban a continuación en la etapa (Ejemplo 1H3) para efectos sobre la activación de NF- $\kappa$ B mediada por APRIL, BAFF y BCMA. Como APRIL es el ligando de alta afinidad a BCMA, se examinan primero las propiedades de bloqueo o agonista de los anticuerpos anti-BCMA en la señalización de APRIL. Como se describe en Ryan 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18), para verificar si los anticuerpos anti-BCMA bloquean o aumentan la señalización de APRIL en sentido descendente, las células de mieloma múltiple humano (MM) NCI-H929 se lavan e incuban en suero RPMI libre durante 24 h antes del tratamiento. Luego las células no se tratan o se tratan con 0,1 mg/ml de TNF- $\alpha$  (utilizado como control positivo), 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL truncado HT tratado con calor, 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL truncado, control de isotipo de 0,1 pM a 200 nM, o anticuerpos anti BCMA de 0,1 pM a 200 nM durante 20 min. Para evaluar el bloqueo de APRIL, las células pretratadas durante 20 min con 0,1 pM a 200 nM de anticuerpos anti-BCMA o un anticuerpo de control de isotipo respectivo se tratan con 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL truncado. Las células se recogen, se lavan y se someten a lisis con 50 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5), 1 % de NP40, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA, 1 mmol/l de EGTA suplementado con proteasa, e inhibidores de la fosfatasa. Los extractos de proteínas se analizan luego para la actividad de NF- $\kappa$ B usando un kit de ensayo quimioluminiscente TransAM® (Active Motif) y la lectura de la señal luminiscente se realiza con un lector de placas Fusion HT (Packard Instruments).

Como la actividad de NF- $\kappa$ B se analiza usando un ELISA funcional que detecta la señal quimioluminiscente de p65 unida a la secuencia consenso de NF- $\kappa$ B, anticuerpos anti-BCMA que no alteran la señalización posterior mediada por APRIL y la activación de NF- $\kappa$ B (es decir, que señal luminiscente media detectada por ELISA en extractos nucleares de células NCI-H929 MM tratadas solo con APRIL es similar, no significativamente reducida o aumentada, a la de extractos nucleares de células NCIH929 MM tratadas con APRIL y anticuerpos anti-BCMA) se seleccionan para los siguientes pasos abajo.

b) Se evaluó si la unión de anticuerpos anti-BCMA interfiere con la activación de NF $\kappa$ B inducida por APRIL, una ruta de señalización posterior conocida de BCMA. Brevemente, las células H929 se privaron de alimento en RPMI1640 con 0,25 % de FCS durante 24 horas a 37 °C en una incubadora de células. Al final del tiempo de inanición, las células se cosecharon, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. Las células viables se ajustaron a 4 x 10<sup>6</sup> células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 30  $\mu$ l de esta suspensión celular se dividieron en alícuotas por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se preincubaron con anticuerpos anti-BCMA (15 o 50  $\mu$ g/ml) o anticuerpos de control de isotipo (10, 20 y 40  $\mu$ g/ml) durante 20 min en incubadora de células. Después, las células se suplementaron con 1  $\mu$ g/ml de  $\Delta$ -APRIL de ratón recombinante marcado con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, n.º 7907-AP-010) durante 40 min a 37 °C. Se usó  $\Delta$ -APRIL inactivado por calor (HI APRIL) en el ensayo para confirmar la especificidad de la señal de NF $\kappa$ B inducida por A-APRIL (la inactivación por calor se realizó por tratamiento de A-APRIL a 60 °C durante 1 h). Al final del tiempo de incubación, las células se cosecharon, se lavaron, se lisaron y se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante del Nuclear Extract Kit (Active Motif, n.º 40410). Los extractos de proteínas se analizaron para la actividad de NF- $\kappa$ B usando un kit de ensayo TransAM © Nf $\kappa$ B p65 Chemo (Active Motif, n.º 40097) siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal luminiscente se leyó utilizando el luminómetro Spectra Max M5 (Molecular Devices). Se midió la intensidad relativa de la señal de luminiscencia obtenida usando células H929 tratadas como se describe

anteriormente. La señal de luminiscencia obtenida tras la unión de  $\Delta$ -APRIL en presencia del control de isotipo se estableció en uno; las otras señales fueron normalizadas.

#### **Ejemplo 1H4. El anticuerpo BCMA no bloquea ni aumenta la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de BAFF**

5

**[0144]** Los anticuerpos seleccionados como activación de NF- $\kappa$ B no bloqueante y no creciente de APRIL en la etapa (Ejemplo 1H3) anterior se prueban luego en la etapa (Ejemplo 1H3) para los efectos sobre la activación de NF- $\kappa$ B mediada por BAFF. Como se describe en Ryan 2007, (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18), para verificar si los anticuerpos BCMA bloquean o aumentan la señalización posterior de BAFF que conduce a la activación de NF- $\kappa$ B.

10 Las células NCI-H929 MM (CRL 9068<sup>TM</sup>) se lavan y se incuban en medio RPMI libre de suero durante 24 h antes del tratamiento, como se describe en Ryan 2007, (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18). Las células entonces no se tratan o se tratan con 0,1  $\mu$ g/ml de TNF- $\alpha$ , 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de BAFF truncado HT tratado con calor, 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de BAFF truncado, de 0,1 pM a 200 nM con isotipo de control, o anticuerpos anti-BCMA de 0,1 pM a 200 nM durante 20 min. Para evaluar el bloqueo de BAFF, las células pretratadas durante 20  
15 minutos con 0,1 pM a 200 nM de anticuerpos anti-BCMA o un anticuerpo control de isotipo respectivo se tratan con 1  $\mu$ g/ml de BAFF truncado. Las células se cosechan, lavan y lisan con 50 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5), 1 % de NP40, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA, 1 mmol/l de EGTA suplementado con proteasa e inhibidores de la fosfatasa. Los extractos de proteínas se analizan luego para la actividad de NF- $\kappa$ B usando un kit de ensayo quimioluminiscente TransAM® (Active Motif) y la lectura de la señal luminiscente se realiza con un lector de placas Fusion HT (Packard  
20 Instruments). Anticuerpos anti-BCMA que no alteran la señalización posterior mediada por BAFF y la activación de NF- $\kappa$ B (es decir, que la señal luminiscente media de p65 se une a la secuencia consenso NF- $\kappa$ B detectada por ELISA en extractos nucleares de células NCI-H929 MM tratadas con BAFF solo es similar, no significativamente reducida o aumentada, al de los extractos nucleares de células NCI-H929 MM tratadas con BAFF y anticuerpos anti-BCMA) se seleccionan para los siguientes pasos a continuación.

25

#### **Ejemplo 1H5. El anticuerpo BCMA no induce la activación de NF- $\kappa$ B por sí mismo**

**[0145]**

30 a) Los anticuerpos seleccionados como activación de NF- $\kappa$ B no bloqueante y no creciente de BAFF en el paso (Ejemplo 1H4) anterior se prueban luego en el paso (Ejemplo 1H5) por sus efectos agonísticos intrínsecos para mediar en la activación de NF- $\kappa$ B. Para verificar si los anticuerpos BCMA son agonistas e inducen la señalización posterior por sí mismos, las células NCI-H929 se lavan e incuban en medio RPMI sin suero durante 24 h antes del  
35 tratamiento. A continuación, las células no se tratan o se tratan con 0,1  $\mu$ g/ml de TNF- $\alpha$ , 0,1 pM a 200 nM de control de isotipo o 0,1 pM a 200 nM de anticuerpos anti-BCMA durante 20 min. Las células se cosechan, lavan y lisan con 50 mmol/l de Tris-HCl (pH 7,5), 1 % de NP0, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA, 1 mmol/l de EGTA suplementado con proteasa e inhibidores de la fosfatasa. Los extractos de proteínas se analizan luego para la actividad de NF- $\kappa$ B usando un kit de ensayo quimioluminiscente TransAM® (Active Motif) y la lectura de la señal  
40 luminiscente se realiza con un lector de placas Fusion HT (Packard Instruments). Anticuerpos anti BCMA que no inducen señalización posterior y activación de NF- $\kappa$ B (es decir, que la señal luminiscente media de p65 unida a la secuencia consenso de NF- $\kappa$ B detectada por ELISA en extractos nucleares de células NCI-H929 MM tratadas solo con anticuerpos anti BCMA es similar, no significativamente aumentada, al de los extractos nucleares de células NCI-H929 MM tratadas con anticuerpo de control de isotipo) finalmente se seleccionan para la producción adicional y la caracterización in vitro e in vivo. Representan los anticuerpos anti-BCMA que son bloqueadores sin ligando, no  
45 competitivos y sin señalización (ver Tabla 10).

b) Se evaluó si la unión de anticuerpos anti-BCMA a células H929 que expresan BCMA induce la activación de NF $\kappa$ B, una vía de señalización posterior conocida de BCMA. Brevemente, las células H929 se privaron de alimento en RPMI1640 con 0,25 % de FCS durante 24 horas a 37 °C en una incubadora de células. Al final del tiempo de  
50 inanición, las células se cosecharon, se contaron y se evaluó la viabilidad celular usando ViCell. Las células viables se ajustaron a 4 x 10<sup>6</sup> células por ml en tampón de tinción FACS que contiene BSA (BD Biosciences). 30 ml de esta suspensión celular se alicuotaron adicionalmente por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron con 30 ml de anticuerpos anti-BCMA a 100 o 350 nM (14 o 50  $\mu$ g/ml) durante 20 min a 37 °C. Como controles negativos, las células se dejaron sin tratar o se incubaron con los anticuerpos de control de isotipo IgG  
55 correspondientes 100 nM (14  $\mu$ g/ml) durante 20 min a 37 °C. Como controles positivos, las células se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de  $\Delta$ -APRIL de ratón recombinante marcado con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, n.º 7907-AP-010) durante 20 min a 37 °C. Al final del tiempo de incubación, las células se cosecharon, se lavaron, se lisaron y se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante del Nuclear Extract Kit (Active Motif, n.º 40410). Los extractos de proteína se analizaron para la actividad de NF $\kappa$ B usando un kit de ensayo TransAm © NF $\kappa$ B p65 Chemo (Active

Motif, n.º 40097) siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal luminiscente se leyó utilizando el luminómetro Spectra Max M5 (Molecular Devices). Se midió la intensidad relativa de la señal de luminiscencia obtenida a partir de células H929 tratadas como se describió anteriormente. La señal de luminiscencia obtenida tras la unión de  $\Delta$ -APRIL en presencia del control de isotipo se estableció en uno; las otras señales fueron normalizadas.

5

**Tabla 10: paradigma de cribado para la selección de anticuerpos BCMA**

Paso de evaluación (en orden cronológico)	Criterio de selección	Descripción de la técnica
1) Unión a BCMA	Unión	Unión a células BCMA unidas a placas (ELISA)
2) Unión a BCMA sin reducir por 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL o BAFF	Sin reducir	La unión a células BCMA unidas a placas no está afectada por 100ng/ml, preferiblemente 1000 ng/ml de APRIL o BAFF (ELISA)
3) Sin activación de NF- $\kappa$ B en la señalización posterior 3.1) ¿El anticuerpo anti-BCMA bloquea o aumenta la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de APRIL? 3.2) ¿El anticuerpo anti-BCMA bloquea o aumenta la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de BAFF? 3.3) ¿El anticuerpo anti-BCMA induce la activación de NF- $\kappa$ B por sí mismo?	Sin cambios en los tres cambios	Activación dependiente de APRIL/BAFF en líneas celulares de MM NCI-H929 (ELISA quimioluminiscente)

**Ejemplo 2 - Producción de anticuerpos anti-BCMA terapéuticos que no bloquean la unión del ligando (APRIL, BAFF) y que ni promueven ni bloquean la señalización a través del dominio intracelular de BCMA y cuya unión a BCMA no se ve afectada por 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/mL de APRIL o por 100 ng/ml, preferiblemente 1000 ng/mL de BAFF**

10

**[0146]** Si los anticuerpos seleccionados después del paso (Ejemplo 1H5) anterior se derivan de la selección in vitro de la biblioteca de anticuerpos recombinantes, entonces ya son anticuerpos IgG1 humanos no conjugados. Esos anticuerpos seleccionados después de la etapa (Ejemplo 1H5) anterior que se derivan de la inmunización están en un formato quimérico rata-humano y luego se humanizan preferiblemente para poder aplicarlos para la terapia. En ese caso, los métodos de humanización de anticuerpos estándar se aplican transfiriendo las regiones determinantes de complementariedad de esas regiones variables de rata a marcos de región variable de anticuerpo humano. Se introducen mutaciones adicionales en las regiones variables, si es necesario, para recuperar la unión a BCMA en comparación con el anticuerpo parental quimérico.

15

20

**[0147]** Para la producción del anticuerpo, las células se cotransfectan con dos plásmidos (uno para la expresión de la cadena pesada del anticuerpo y otro para la expresión de la cadena ligera del anticuerpo), en una relación de 1:1, respectivamente. Las células se cultivan como cultivos de monocapa adherentes en matraces T usando medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10 %, y se transfectan cuando están confluentes entre 50 y 80 %. Para la transfección de un matraz T75, se siembran 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10 % V/V final), 250  $\mu$ g/ml de neomicina, y las células se colocan a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche. Para cada matraz T75 a transfectar, se prepara una solución de ADN, CaCl<sub>2</sub> y agua mezclando 47  $\mu$ g de ADN del vector plasmídico total dividido por igual entre los vectores de expresión de cadena ligera y pesada, 235  $\mu$ l de una solución de CaCl<sub>2</sub> 1M, y añadiendo agua a un volumen final de 469  $\mu$ l. A esta solución, se añaden 469  $\mu$ l de una solución de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM a pH 7,05, se mezclan inmediatamente durante 10 segundos y se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 20 segundos. La suspensión se diluye con 12 ml de DMEM suplementado con FCS al 2 % y se agrega al T75 en lugar del medio existente. Las células se incuban a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 17 a 20 horas, luego el medio se reemplaza con 12 ml de DMEM, 10 % de FCS. El medio de cultivo acondicionado se recoge de 5 a 7 días después de la transfección, se centrifuga durante 5 min a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantiene a 4 °C.

25

30

35

**[0148]** Los anticuerpos secretados se purifican por cromatografía de afinidad de Proteína A, seguido de cromatografía de intercambio catiónico y una etapa cromatográfica de exclusión por tamaño final en una columna Superdex® 200 (Amersham Pharmacia) intercambiando el tampón por tampón fosfato salino y recogiendo los anticuerpos monoméricos IgG1 puros. La concentración de anticuerpo se estima utilizando un espectrofotómetro a partir de la absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos se formularon en una disolución de fosfato de potasio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM y glicina 100 mM de pH 6,7.

### **Ejemplo 3 - Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3**

#### **10 Ejemplo 3A. Generación de anticuerpos anti-CD3**

**[0149]** Las siguientes secuencias de proteínas de las regiones VH y VL se usan para generar anticuerpos CD3e reactivos cruzados humanos y de macaco como se describe en el documento WO2007/042261.

#### **15 H2C\_VH (SEQ ID NO: 7):**

**[0150]**

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY  
YADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVT  
VSS

20

#### **H2C\_VL (SEQ ID NO: 8)**

**[0151]**

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF  
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYICALWYSNRWVFGGGTKLTVL

25

**[0152]** Brevemente, los oligonucleótidos que codifican las secuencias anteriores se unen entre sí por PCR para sintetizar ADNc que codifica VH son secuencias VL, respectivamente, del anticuerpo anti CD3.

#### **30 Ejemplo 3B. Generación de formato 1+1 células T biespecíficas anti-BCMA/anti-CD3 con Fc**

**[0153]** Las células T anti-BCMA/anti-CD3 biespecíficas se producen para los anticuerpos anti-BCMA humanos o humanizados seleccionados después del paso (Ejemplo 1H5). Los ADNc que codifican las cadenas pesadas y ligeras completas de los anticuerpos IgG1 anti-BCMA correspondientes, como se describe en el Ejemplo 2, así como los ADNc de VH y VL anti-CD3 descritos en el Ejemplo 3A, se usan como materiales de partida. Para cada anticuerpo biespecífico, están implicadas cuatro cadenas de proteínas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-BCMA correspondiente y las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti CD3 descrito anteriormente, respectivamente. Con el fin de minimizar la formación de productos secundarios con cadenas pesadas incorrectamente apareadas, por ejemplo, con dos cadenas pesadas del anticuerpo anti-CD3, se usa una región Fc heterodimérica mutada que lleva mutaciones "knob-into-hole" y un enlace disulfuro diseñado, como se describe en WO2009080251 y WO2009080252. Con el fin de minimizar la formación de productos secundarios con cadenas ligeras mal apareadas, por ejemplo, con dos cadenas ligeras del anticuerpo anti-BCMA, se aplica un cruce de kappa constante CH1 x a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti CD3 usando la metodología descrita en WO2009080251 y WO2009080252.

45

**[0154]** En resumen, cada anticuerpo biespecífico se produce por cotransfección simultánea de cuatro vectores de expresión de mamífero que codifican, respectivamente: a) el ADNc de la cadena ligera completa del anticuerpo BCMA correspondiente, b) el ADNc de la cadena pesada completa del anticuerpo BCMA correspondiente que porta las mutaciones "hole" en la región Fc para producir un anticuerpo heterodimérico (ver detalles a continuación), c) un ADNc de fusión generado por métodos de biología molecular estándar, tales como PCR por corte y empalme por extensión, que codifica una proteína de fusión hecha de (en orden terminal N- a C-) secuencia líder secretora, VL del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente y dominio CH1 humano de un anticuerpo IgG1 y d)

50

un ADNc de fusión generado por métodos de biología molecular estándar, tales como PC de extensión y solapamiento por fusión, que codifica una proteína de fusión hecha de (en orden terminal N- a C-) secuencia líder secretora, VH del anticuerpo anti-CD3 descrito anteriormente, dominio kappa constante de un ADNc de cadena ligera humana, región bisagra de un anticuerpo IgG1 humano y región Fc (Dominios CH2 y CH3) de un anticuerpo IgG1 humano que incluye una mutación "knob" (ver detalles a continuación) en la región Fc para producir un anticuerpo heterodimérico. Cotransfección de células de mamífero y producción y purificación de anticuerpos usando los métodos descritos anteriormente para la producción de anticuerpos IgG1 humanos o humanizados (véase el Ejemplo 2). Las mutaciones "knob-into-hole" en la región Fc de IgG1 humana consisten en: T366W, conocida como la mutación "knob"; y T366S, L368A e Y407V, conocidas colectivamente como las mutaciones "hole". Además, se puede incluir un disulfuro para aumentar la estabilidad y los rendimientos, así como residuos adicionales que forman puentes iónicos y aumentar los rendimientos de heterodimerización (EP 1870459A1).

#### **Ejemplo 4 - Unión simultánea de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a BCMA y CD3 (resonancia de plasmón superficial)**

**[0155]** Las propiedades de unión a BCMA y CD3 de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 se analizan mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento Biacore® T100 (Biacore AB) con HBS-EP como tampón de ejecución (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20, Biacore). Este sistema está bien establecido para el estudio de las interacciones moleculares. Permite un control continuo en tiempo real de las uniones ligando/analito y, por lo tanto, la determinación de constantes de velocidad de asociación ( $k_a$ ), constantes de velocidad de disociación ( $k_d$ ) y constantes de equilibrio ( $K_D$ ) en diversos ajustes de ensayo. La tecnología SPR se basa en la medición del índice de refracción cerca de la superficie de un chip biosensor recubierto de oro. Los cambios en el índice de refracción indican cambios de masa en la superficie causados por la interacción del ligando inmovilizado con el analito inyectado en la solución. Si las moléculas se unen al ligando inmovilizado en la superficie, la masa aumenta, en caso de disociación, la masa disminuye.

**[0156]** La captura del anticuerpo marcado con anti-His se inmoviliza en la superficie de un biosensorchip CM5 usando química de acoplamiento de aminas. Las células de flujo se activan con una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(N,N-dimetilamino)propil-N etilcarbodiimida 0,1 M a un caudal de 5  $\mu$ l/min. Se inyecta anticuerpo anti-IgG humano en acetato de sodio, pH 5,0 a 10  $\mu$ g/ml, que dio como resultado una densidad superficial de aproximadamente 12000 unidades de resonancia (RU). Una celda de flujo de control de referencia se trata de la misma manera, pero con tampones de vehículo solamente en lugar del anticuerpo de captura. Las superficies se bloquean con una inyección de 1 M etanolamina/HCl pH 8,5. Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti CD3 se diluyen en HBSP y se inyectan a un caudal de 5  $\mu$ l/min. El tiempo de contacto (fase de asociación) es de 1 minuto para los anticuerpos a una concentración entre 1 y 100 nM para la unión de BCMA-ECD y 1 y 200 nM para la interacción de CD3. BCMA-ECD se inyecta a concentraciones crecientes de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 nM, CD3 a concentraciones de 0,21, 0,62, 1,85, 5,6, 16,7, 50, 100 y 200 nM. El tiempo de contacto (fase de asociación) es de 3 min, el tiempo de disociación (lavado con tampón de funcionamiento) de 5 min para ambas moléculas a una velocidad de flujo de 30  $\mu$ l/min. Todas las interacciones se realizan a 25 °C (temperatura estándar). La solución de regeneración de cloruro de magnesio 3 M se inyecta durante 60 s a un flujo de 5  $\mu$ l/min para eliminar cualquier proteína unida no covalentemente después de cada ciclo de unión. Las señales se detectan a una velocidad de una señal por segundo. Las muestras se inyectan en concentraciones crecientes. Se determinan gráficos de SPR que muestran la tasa de señal (es decir, la unidad de resonancia) representada frente al tiempo de contacto.

#### **Ejemplo 5 - Unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a BCMA en células de MM o CD3 en células T (citometría de flujo)**

**[0157]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan mediante citometría de flujo por sus propiedades de unión a BCMA humano expresado en células de mieloma múltiple NCI-H929 o CD3 humano expresado en células T leucémicas humanas Jurkat (ATCC). Brevemente, las células cultivadas se recogen, se cuentan y la viabilidad celular se evalúa usando el método de exclusión con azul de tripano. Las células viables se ajustan luego a  $2 \times 10^6$  células por ml en PBS que contiene 0,1 % de BSA. Se alicuotan adicionalmente 90  $\mu$ l de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añaden 10  $\mu$ l del anticuerpo biespecífico de células T o el correspondiente control de IgG a los pocillos que contienen células para obtener concentraciones finales de 0,1 pM a 200 nM. Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti CD3 y la IgG de control se usan con la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 min a 4 °C, las células se centrifugan (5 min, 350 x g), se lavan con 150  $\mu$ l/pocillo de tampón

de tinción FACS con BSA (BD Biosciences), se resuspenden y se incuban durante 30 min adicionales a 4 °C con 12 µl/pocillo de anticuerpo anti-His conjugado con fluorocromo (Lucerna) para la detección del anticuerpo biespecífico de célula T. Después, las células se lavan mediante la adición de 120 µl/pocillo de FACS Stain Buffer y se centrifuga a 350 x g durante 5 min. Se realiza una segunda etapa de lavado con 150 µl/pocillo de FACS Stain Buffer. Las muestras se resuspenden en tampón de tinción FACS a 200 µl/pocillo, se adquieren y se analizan usando un citómetro de flujo LSR II con el software FACSDiva® (BD Biosciences). Se evalúa la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a células de MM y células T y se determina la intensidad de fluorescencia media en células MM NCI-H929 que expresan BCMA o células Jurkat T que expresan CD3 y se trazan en histogramas o diagramas de puntos.

10

#### **Ejemplo 6 - Activación de células T tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (citometría de flujo)**

**[0158]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan mediante citometría de flujo por su potencial para inducir la activación de células T mediante la evaluación de la expresión superficial del marcador de activación temprana CD69 o el marcador de activación tardía CD25 en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia o ausencia de células MM humanas que expresan BCMA. Brevemente, las células MM NCI-H929 que expresan BCMA se recogen con tampón de disociación celular, se cuentan y se verifica la viabilidad celular usando azul de tripano. Las células MM viables se ajustan a 0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI 1640 completo, se pipetea 100 µl de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añaden 50 µl de construcciones biespecíficas de células T a las células de MM que contienen los pocillos para obtener una concentración final de 1 nM. La placa de 96 pocillos se aparta y se mantiene a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> hasta nuevas manipulaciones.

**[0159]** Se aislaron PBMC de sangre reciente usando centrifugación en gradiente de densidad usando tubos de preparación de células con citrato de sodio (tubos Vacutainer CPT, BD Biosciences). A continuación, se aíslan células T humanas totales utilizando el kit de aislamiento de células Pan T II (Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T totales humanas (efector) se ajustan luego a 2 x 10<sup>6</sup> células por ml en medio RPMI-1640 completo. Se añaden 50 µl de esta suspensión celular por pocillo en la placa de ensayo que contiene ya células de MM que expresan BCMA para obtener una relación E:T final de 5:1. Para probar si las construcciones biespecíficas de células T son capaces de activar células T solo en presencia de BCMA que expresan células diana tumorales de MM, pocillos que contienen concentración(es) final(es) en el intervalo de 0,1 pM a 200 nM de las moléculas biespecíficas respectivas con células efectoras pero sin las células de MM diana tumorales también están incluidas. Después de la incubación durante cinco días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, las células se sedimentan por centrifugación (5 min, 350 x g) y se lavan dos veces con 150 µl/pocillo de FACS Stain Buffer (BD Biosciences). La tinción superficial de las células efectoras con anticuerpos conjugados con fluorocromo seleccionados contra CD4, CD8, CD69 o CD25 humano (BD Biosciences) se realiza a 4 °C durante 30 min, protegidas de la luz, en FACS Stain Buffer (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante las células se lavan dos veces con 150 µl/pocillo de FACS Stain Buffer, se resuspenden en 200 µl/pocillo FACS Stain Buffer y se adquieren y analizan usando un citómetro de flujo LSRII complementado con el software FACSDiva® (BD Biosciences). La expresión de los marcadores de activación de CD69 y CD25 se determina midiendo la intensidad de fluorescencia media regulada en las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> como se representa en histogramas o gráficos de puntos.

#### **Ejemplo 7 - Proliferación de células T tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (dilución CFSE)**

**[0160]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan mediante citometría de flujo por su potencial para inducir la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> en presencia o ausencia de células de MM humanas que expresan BCMA. Brevemente, las células de MM NCI-H929 que expresan BCMA se recogen con tampón de disociación celular, se cuentan y se busca la viabilidad usando azul de tripano. Las células MM viables se ajustan a 0,2 x 10<sup>6</sup> células por ml en medio RPMI completo, se pipetea 100 µl de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añaden 50 µl de construcciones biespecíficas de células T a los pocillos que contienen células de MM para obtener concentración(es) final(es) en el intervalo de 0,1 pM a 200 nM. La placa del pozo se aparta y se mantiene a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>.

**[0161]** Las PBMC se aíslan de sangre fresca usando centrifugación en gradiente de densidad usando tubos Cell Preparation con citrato sódico (tubos Vacutainer CPT, BD Biosciences). A continuación, se aíslan células T humanas totales utilizando el kit de aislamiento de células Pan T II (Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones

del fabricante. Las células T totales se ajustan luego a 1 millón de células por ml en RPMI precalentado sin suero (37 °C) y se tiñen con CFSE 1 mM a temperatura ambiente durante 6 min, protegidas de la luz. El volumen de tinción se duplica luego mediante la adición de medio RPMI-1640 suplementado con FCS al 10 % y GlutaMax al 1 % para detener la tinción con CFSE. Después de la incubación a temperatura ambiente durante otros 20 minutos, las células se lavan tres veces con medio que contiene suero precalentado para eliminar el CFSE restante. Las células T totales (efector) teñidas con CFSE se ajustan luego a  $2 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI-1640 completo. Se añaden 50 ml de esta suspensión celular por pocillo en la placa de ensayo que ya contiene células MM NCI-H929 que expresan BCMA para obtener una relación E:T final de 5:1. Para probar si las construcciones biespecíficas de células T son capaces de activar células T solo en presencia de BCMA que expresan células diana tumorales de MM, también se incluyen pocillos que contienen 1 nM de anticuerpos biespecíficos de células T con células efectoras pero sin células diana tumorales de MM. Después de la incubación durante cinco días a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, las células se sedimentan por centrifugación (5 min, 350 x g) y se lavan dos veces con 150 µl/pocillo de FACS Stain Buffer (BD Biosciences). La tinción superficial de las células efectoras con anticuerpos conjugados con fluorocromo seleccionados contra CD4, CD8 o CD25 humano (BD) se realiza a 4 °C durante 30 min, protegido de la luz, en Tacs Stain Buffer de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se lavan dos veces con 150 µl/pocillo de FACS Stain Buffer, se resuspenden en 200 µl/pocillo de FACS Stain Buffer, y se adquieren y analizan usando un citómetro de flujo LSR II complementado con el software FACSDiva® (BD). El porcentaje de células no proliferativas se determina al activar el pico de CFSE sin diluir en el extremo derecho en el grupo en el que los pocillos contienen células de MM que expresan BCMA y células T teñidas con CFSE, pero sin los anticuerpos biespecíficos de células T, y lo compararon con otros grupos (pocillos). El porcentaje de células en proliferación se mide al bloquear todos los picos de CFSE diluidos, excluyendo el pico del extremo derecho (si es posible observarlo). El nivel de proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se determina activando primero esa población y luego observando los picos de dilución CFSE.

## 25 **Ejemplo 8 - Producción de citoquinas a partir de células T activadas tras el acoplamiento de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3**

### **Ejemplo 8A. Producción de interferón-γ**

30 **[0162]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan por su potencial para inducir la producción de interferón-γ (IFN-γ) por las células T en presencia o ausencia de células de MM que expresan BCMA humanas. Brevemente, las células MM NCI-H929 que expresan BCMA se recogen con tampón de disociación celular, se cuentan y se busca la viabilidad usando azul de tripano. Aproximadamente 20,000 células viables por pocillo se siembran en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se añade la dilución de anticuerpo respectiva para obtener concentración(es) final(es) en el intervalo de 0,1 pM a 200 nM. Las IgG anti-humanas y las IgG anti-CD3 ajustadas a la misma molaridad se usan como controles. Se añaden células T efectoras totales humanas para obtener una relación E:T final de 5:1. Después de 20 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, los niveles de IFN-γ humano en el sobrenadante se miden por ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (IFN-γ ELISA Kit II, BD Biosciences). Los niveles de IFN-γ producidos por células T en presencia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 y células de MM que expresan BCMA se miden y trazan en histogramas y se comparan con los producidos por células T en presencia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 y sin células de MM que expresan BCMA.

### **Ejemplo 8B. Ensayo de liberación de citocina (análisis CBA)**

45 **[0163]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan por su potencial para inducir la producción de citocina mediada por células T en presencia o ausencia de células MM que expresan BCMA humanas. Las PBMC se aíslan de sangre fresca usando centrifugación en gradiente de densidad usando tubos de preparación de células con citrato sódico (tubos Vacutainer CPT, BD Biosciences) y una concentración celular final de 0,3 millones de células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. A continuación, se añaden células MM NCI-H929 que expresan BCMA para obtener una relación E:T final de 10:1, así como constructos biespecíficos de células T y controles de IgG para obtener concentraciones finales en el intervalo de 0,1 pM a 200 nM, para una incubación de 24 h a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las células se centrifugan durante 5 min a 350 x g y el sobrenadante se transfiere a una nueva placa de 96 pocillos de pozo profundo para el análisis posterior. El análisis de CBA se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el citómetro de flujo LSR II, utilizando el kit II de citoquinas Th1/Th2 humanas (BD Biosciences) que incluye IL-2 humana, IL-4 humana, IL-6 humana, IL-10 humana, humana TNF-α e IFN-γ humano. Los niveles de citocinas producidas por células T en presencia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 y células de MM que expresan BCMA se miden y trazan en histogramas y se comparan con los producidos por células T en



presencia de anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 y sin células MM que expresan BCMA.

**Ejemplo 9 - Citotoxicidad de células T redirigidas de células de MM tras la unión cruzada de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a CD3 en células T y BCMA en células de MM (ensayo de liberación de LDH)**

**[0164]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti CD3 generados en el Ejemplo 3 también se analizan por su potencial para inducir apoptosis mediada por células T en células de MM que expresan BCMA tras la reticulación de la construcción mediante la unión de los restos de unión a antígeno a BCMA en las células.

10 Brevemente, las células diana de mieloma múltiple NCI-H929 que expresan BCMA humano se recolectan con un tampón de disociación celular, se lavan y resuspenden en RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Invitrogen). Aproximadamente, 30,000 células por pocillo se siembran en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y la dilución respectiva de la construcción se agrega para una concentración final deseada (por triplicado); concentraciones finales que varían de 0.1 pM a 200 nM. Para una comparación apropiada, todos los constructos y

15 controles biespecíficos de células T se ajustan a la misma molaridad. Se agregan células T totales humanas (efector) a los pocillos para obtener una relación E:T final de 5:1. Cuando se usan PBMC humanas como células efectoras, se usa una relación E:T final de 10:1. PHA-L (Sigma) se usa como control positivo para la activación de células T humanas a una concentración de 1 µg/ml. Los grupos de control negativos están representados solo por células efectoras o de destino. Para la normalización, la lisis máxima de las células diana NCI-H929 MM (= 100 %) se determina mediante la incubación de las células diana con una concentración final de Triton X-100 al 1 %, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0 %) está representada por células diana coincubadas solo con células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico de células T. Después de 20 h de incubación a 37 °C,

20 5 % de CO<sub>2</sub>, se mide la liberación de LDH desde las células diana de MM apoptóticas/necróticas en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se representa frente a las concentraciones de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en curvas de concentración-respuesta. Los valores de IC<sub>50</sub> se miden usando el software Prism (GraphPad) y se determinan como la concentración de anticuerpo biespecífico de células T que da como resultado un 50 % de liberación de LDH.

**30 Ejemplo 10 - Comparación de anticuerpos biespecíficos de células T que contienen un anticuerpo anti-BCMA no ligando bloqueante/no competitivo frente a un anticuerpo anti-BCMA ligando bloqueante/competitivo sobre la potencia de eliminación de células de MM que expresan BCMA**

**[0165]** En ciertas enfermedades malignas hematológicas tales como el mieloma múltiple, el nivel de ligandos de BCMA circulantes APRIL y BAFF puede ser elevado (Moreaux y col., 2004; Blood 103 (8): 3148-3157). Por lo tanto, los inventores reconocen que altos niveles de ligandos en el suero pueden interferir con la unión de anticuerpos anti-BCMA a BCMA en las células tumorales. En comparación con los donantes sanos, los niveles de APRIL circulante (el ligando de alta afinidad a BCMA) en pacientes con MM son de ~ 100 ng/ml frente a ~ 10 ng/ml. Para BAFF (ligando de baja afinidad a BCMA), los niveles pueden fluctuar de 1-1000 ng/ml en comparación con ~3

40 ng/ml en donantes sanos. Cerca de las células tumorales, las concentraciones de APRIL/BAFF pueden ser incluso mayores que las medidas en el suero. En ciertas enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, los niveles de APRIL circulante también son elevados con ~ 85 ng/ml (Koyama y col., 2005; Ann Rheum Dis 64: 1065-1067).

45 **[0166]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 generados en el Ejemplo 3 que contienen un anticuerpo anti-BCMA no ligando bloqueante/no competitivo también se analizan por su potencial para inducir apoptosis mediada por células T en BCMA que expresan células de MM tras la unión cruzada de la construcción mediante la unión de las mitades de unión a antígenos a BCMA en células en presencia de concentraciones elevadas (es decir, 100 ng/ml a 1000 ng/ml) de APRIL o BAFF en comparación con anticuerpos

50 biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 que contienen un anticuerpo anti-BCMA ligando bloqueante/competitivo del mismo formato.

**[0167]** Como se muestra en la Figura 1, las concentraciones crecientes (es decir, 10, 100, 1000 ng/ml) de APRIL o BAFF solubles representativas de los niveles encontrados en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple no alteran la unión de un anticuerpo anti-BCMA no ligando bloqueante/no competitivo al BCMA unido a la placa (línea continua). Por el contrario, las altas concentraciones de APRIL o BAFF solubles representativas de los niveles (es decir, 100 ng/ml a 1000 ng/ml) encontradas en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple disminuyen la unión de un anticuerpo anti-BCMA ligando bloqueante/competitivo a BCMA unido a la placa (línea punteada).

**[0168]** Como se muestra en la Figura 2, las concentraciones crecientes (es decir, 10, 100, 1000 ng/ml) de APRIL soluble o BAFF representativas de los niveles encontrados en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple no alteran la potencia de eliminación de un anticuerpo biespecífico de células T que contiene un anticuerpo anti-BCMA no ligando bloqueante/no competitivo, específico para células de MM que expresan BCMA (línea continua). Por el contrario, las altas concentraciones (es decir, 100 ng/ml a 1000 ng/ml) de APRIL o BAFF solubles representativas de los niveles encontrados en la sangre y médula ósea de pacientes con mieloma múltiple disminuyen la potencia de eliminación de un anticuerpo biespecífico de células T que contiene anticuerpo anti-BCMA ligando bloqueante/competitivo específico para células MM que expresan BCMA (línea de puntos).

**Ejemplo 10A. Propiedades de unión de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a células de MM que expresan BCMA con un anticuerpo anti-BCMA no ligando de unión/bloqueante, no competitivo, en presencia de 10, 100, 1000 ng/ml de APRIL o BAFF (citometría de flujo)**

**[0169]** Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un anticuerpo anti-BCMA no ligando de unión/bloqueante, no competitivo generado en el Ejemplo 3 se analizan mediante citometría de flujo por sus propiedades de unión a BCMA humano expresado en células de mieloma múltiple NCI- H929 en presencia de 10, 100 y 1000 ng/ml de APRIL o BAFF. Brevemente, las células cultivadas se recogen, se cuentan y la viabilidad celular se evalúa usando el método de exclusión con azul de tripano. Las células viables se ajustan luego a  $2 \times 10^6$  células por ml en PBS que contiene 0,1 % de BSA. Se alicuotan adicionalmente 90  $\mu$ l de esta suspensión celular por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se añaden 10  $\mu$ l del anticuerpo biespecífico de células T o el correspondiente control de IgG a los pocillos que contienen células para obtener preferiblemente concentraciones finales que varían de 0,1 pM a 200 nM. Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 y la IgG de control se usan con la misma molaridad. Después de la incubación durante 30 minutos a 4 °C, las células se centrifugan (5 min, 350 x g), se lavan con 150  $\mu$ l/pocillo de tampón de tinción FACS con BSA (BD Biosciences), se resuspenden y se incuban durante 30 min adicionales a 4 °C con anticuerpo anti-His conjugado con fluorocromo (Lucerna) a 12  $\mu$ l/pocillo para la detección del anticuerpo biespecífico de células T. Después, las células se lavan mediante la adición de 120  $\mu$ l/pocillo de FACS Stain Buffer y se centrifuga a 350 x g durante 5 min. Se realiza una segunda etapa de lavado con 150  $\mu$ l/pocillo de FACS Stain Buffer. Las muestras se resuspenden en tampón de tinción FACS a 200  $\mu$ l/pocillo, se adquieren y se analizan usando un citómetro de flujo LSR II con el software FACSDiva® (BD Biosciences). Se evalúa la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a células de MM y células T y se determina la intensidad media de fluorescencia en células MM NCI-H929 que expresan BCMA y se representan gráficamente en histogramas o gráficas de puntos. La unión (por ejemplo, MFI) de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti CD3 con un anticuerpo anti-BCMA no ligando de unión/bloqueante, no competitivo a las células de MM se compara entonces con la de un anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un anticuerpo anti-BCMA ligando de unión/bloqueante, competitivo en presencia de 0, 10, 100, 1000 ng/ml de APRIL o BAFF.

**Ejemplo 10B. Propiedades de eliminación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un anticuerpo anti-BCMA no ligando de unión/bloqueante, no competitivo, en presencia de 10, 100, 1000 ng/ml de APRIL o BAFF: citotoxicidad de célula T redirigida de las células de MM que expresan BCMA (ensayo de liberación de LDH)**

**[0170]** Se analizan los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un anticuerpo anti-BCMA no ligando de unión/bloqueante, no competitivo generado en el Ejemplo 3, por su potencial para inducir apoptosis mediada por células T en células de MM que expresan BCMA tras la reticulación del constructo mediante la unión de las mitades de unión a antígeno a BCMA en células, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes (es decir, 10, 100, 1000 ng/ml) de APRIL o BAFF. Brevemente, las células diana de mieloma múltiple NCI-H929 que expresan BCMA humano se recolectan con tampón de disociación celular, se lavan y resuspenden en RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Invitrogen). Aproximadamente, 30000 células por pocillo se siembran en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y la dilución respectiva del anticuerpo biespecífico de células T se agrega preferiblemente para concentración(es) en el intervalo de 0,1 pM a 200 nM (por triplicado). Para una comparación apropiada, todos los anticuerpos y controles biespecíficos de células T se ajustan a la misma molaridad. Se añaden concentraciones crecientes (es decir, 10, 100, 1000 ng/ml) de APRIL o BAFF recombinante humano soluble a los cultivos celulares. Los pozos sin adición de APRIL o BAFF también se incluyen en la placa como controles. Luego, se agregan células T totales humanas (efector) a los pocillos para obtener una relación E:T final de 5:1. Cuando se usan PBMC humanas como células efectoras, se usa una relación E:T final de 10:1. PHA-L (Sigma) se usa como control positivo para la activación de células T humanas a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. Los grupos de control negativos están representados solo por células efectoras o de destino. Para la normalización, la

lisis máxima de las células diana NCI-H929 MM (= 100 %) se determina mediante la incubación de las células diana con una concentración final de Triton X-100 al 1 %, induciendo la muerte celular. La lisis mínima (= 0 %) está representada por células diana co-incubadas únicamente con células efectoras, es decir, sin ninguna construcción o anticuerpo. Después de 20 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, se mide la liberación de LDH desde las células diana de MM apoptóticas/necróticas en el sobrenadante con el kit de detección de LDH (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de LDH se representa gráficamente frente a las concentraciones de APRIL o BAFF en presencia de concentración de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 preferiblemente en el intervalo de concentración de 0,1 pM a 200 nM en curvas de concentración-respuesta. Después se miden los valores IC<sub>50</sub> usando el software Prism (GraphPad). Los valores IC<sub>50</sub> de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un anticuerpo anti-BCMA no ligando de unión/bloqueante, no competitivo se comparan entonces con los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un anticuerpo anti-BCMA ligando de unión/bloqueante, competitivo en presencia de 0, 10, 100, 1000 ng/ml de APRIL o BAFF.

#### 15 **Ejemplo 11 - Evaluación de la eficacia terapéutica de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en el modelo de ratón de mieloma múltiple Vk\*MYC**

[0171] Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 de reacción cruzada murinos se evalúan en cuanto a su potencial para prevenir el mieloma múltiple en ratones propensos al mieloma múltiple Vk\*MYC como se describe en Chesi, 2012 (Chesi y col., 2012; Blood 120: 376-385). El mieloma múltiple es una neoplasia maligna hematológica que implica una expansión descontrolada de las células plasmáticas en la médula ósea. Dado que el BCMA se expresa con fuerza en las células plasmáticas malignas, planteamos la hipótesis de que un anticuerpo biespecífico de célula T anti-BCMA/anti-CD3 será eficaz para el tratamiento del mieloma múltiple. El modelo de ratón de mieloma múltiple Vk\*MYC es altamente representativo del mieloma humano y predictivo de la respuesta al fármaco utilizado en la clínica; representa una excelente herramienta para probar la prueba de concepto preclínica de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3. Brevemente, los ratones Vk\*MYC obtenidos a partir de una colaboración académica en Mayo Clinic Arizona se cruzan con ratones transgénicos humanos CD3e (huCD3e Tg). Las células T de los ratones huCD3e Tg x Vk\*MYC expresan CD3e humano y CD3e de ratón en la superficie celular y, por lo tanto, los ratones responden a los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3. Los ratones Vk\*MYC desarrollan uniformemente una gammopatía monoclonal iniciada alrededor de las 30 semanas de vida que progresa lentamente a lo largo del tiempo y se asocia con signos clínicos representativos del mieloma humano, como anemia, osteoporosis y enfermedad renal. Los ratones se sangran periódicamente a través de la cola y la sangre se recoge en tubos Microtainer (BD Biosciences), se deja coagular a temperatura ambiente y luego se centrifuga durante 10 minutos a 2300 g. Los sueros se diluyen 1:2 en tampón salino normal y se analizan en un aparato de cámara QuickGel utilizando QuickGel prefabricado (Helena Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La relación gamma/albumina y las fracciones de suero se miden por análisis densitométrico.

[0172] Para estudios terapéuticos, los ratones Vk\*MYC se incluyen y asignan al azar a diferentes grupos de tratamiento (n = 5-8/grupo): por ejemplo, 1) IgG de control; 2) anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3; 500 µg/kg/semana o 10 µg/ratón/semana administrados por vía intravenosa a través de la vena de la cola; 3) bortezomib 1 mg/kg/i.p. en los días 1,4,8,11 utilizados como estándar de cuidado. Preferiblemente, la(s) dosis(s) de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 podrían ser múltiples y variar de 200 a 1000 µg/kg/semana. En cada grupo, al menos tres ratones Vk\*MYC envejecidos (> 1 año) con una relación gamma/albumina entre 0,3-2,0, que corresponde a un pico M predominante entre aproximadamente 10-70 g/l medido por densitometría. La electroforesis de proteínas séricas (SPEP) se realiza el día 0 y el día 14 después del tratamiento para medir la reducción mediada por el tratamiento en el pico M como un marcador de respuesta tumoral, como se hace en la clínica. En algunos estudios terapéuticos, se reclutan ratones Vk\*MYC trasplantados con un pico M de aproximadamente 10-70 g/l y una plasmacitosis de médula ósea superior al 5 % y se asignan a diferentes grupos de tratamiento. Se evalúa la eficacia de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 para reducir el pico M.

#### **Ejemplo 12 - Evaluación de la eficacia terapéutica en el modelo de ratón propenso al lupus NZB/W de lupus eritematoso sistémico**

[0173] Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 de reacción cruzada murinos se evalúan en cuanto a su potencial para prevenir el lupus eritematoso sistémico (SLE) en ratones propensos NZB/W, un modelo bien caracterizado (Hass y col., 2010; J Immunol 184 (9): 4789 - 4800). Existe una evidencia acumulada que sugiere que las células plasmáticas autorreactivas juegan un papel importante en el LES y la reducción de las

- células plasmáticas autorreactivas con un anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 podría ser beneficioso para los pacientes con LES. Brevemente, los ratones NZB y NZW se adquieren del Laboratorio Jackson y se cruzan con ratones huCD3ε Tg. Los ratones NZB x huCD3ε Tg y los ratones NZW x huCD3ε Tg se cruzan luego entre sí y se seleccionan ratones hembra huCD3ε Tg x NZB/W F1 para estudios futuros. Los ratones se someten a pruebas semicuantitativas de proteinuria con tiras reactivas Albustix (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) cada dos semanas, y se puntúan en una escala de 0 a 4 según la concentración de proteína (de 0 a ≥20 g/l). Los ratones hembra huCD3ε Tg x NZB/W F1 de 7-8 meses de edad se inscribieron en estudios terapéuticos y se aleatorizaron en diferentes grupos de tratamiento (n = 16/grupo): por ejemplo, 1) IgG de control; 2) anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3; 500 µg/kg/semana o 10 µg/ratón/semana administrados por vía intravenosa a través de la vena de la cola; 3) anti-BAFF 20 mg/kg/semana utilizado como estándar de cuidado. Preferiblemente, la(s) dosis de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 podrían ser múltiples y variar de 200 a 1000 µg/kg/semana. Los niveles de proteína de referencia al inicio de los estudios terapéuticos están entre 30 y 300 mg/dL.
- 15 **[0174]** Los criterios de valoración clínicos representativos de LES consisten en proteinuria, enfermedades renales y manifestaciones tales como glomerulonefritis, celularidad glomerular y aumento de tamaño, depósitos periódicos de ácido Schiff (PAS) positivos, y aparición de autoanticuerpos en sueros tales como ADNds, IgA total, IgG e IgM medidos por ELISA.

## 20 LISTADO DE SECUENCIAS

### [0175]

- <110> ENGMAB AG
- 25 <120> Anticuerpo biespecíficos contra CD3É\233 y BCMA
- <130> TCB-PCT
- 30 <150> EPEP13000570
- <151> 2013-02-05
- <150> EPEP13000571
- <151> 2013-02-05
- 35 <160> 96
- <170> BiSSAP 1.2
- 40 <210> 1
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- 45 <400> 1
- |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | Gly | Ser | Ser | Thr | Gly | Ala | Val | Thr | Ser | Gly | Tyr | Tyr | Pro | Asn |
|  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |
- <210> 2
- 50 <211> 7
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 2
- 55

Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro  
1 5

<210> 3  
<211> 9  
5 <212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 3

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val  
1 5

10  
  
<210> 4  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> Mus musculus  
  
<400> 4

Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn  
1 5 10

20  
<210> 5  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
25  
<400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15  
Val Lys Asp

30 <210> 6  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 6

35 His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr  
1 5 10

<210> 7  
<211> 109  
40 <212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 7

# ES 2 667 420 T3

Gln	Thr	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Ser	Gly
			20					25					30		
Tyr	Tyr	Pro	Asn	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly
			35					40					45		
Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Lys	Phe	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Val
65					70					75					80
Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
				85					90					95	
Arg	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu			
			100					105							

<210> 8

<211> 125

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Lys	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45		
Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr
65					70					75					80
Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
				85					90					95	
Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Trp
			100					105					110		
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
			115				120					125			

10

<210> 9

<211> 105

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 9

Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
1				5					10					15	
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
			20					25					30		
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
		35					40					45			
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
	50					55					60				
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
65					70					75					80
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
			85						90					95	
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
			100					105							

<210> 10

<211> 103

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys									
			100												

10

<210> 11

<211> 39

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..39

20 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="primer" /organism="Artificial Sequence"

<400> 11

aagcttgat ccatgttgca gatggctggg cagtgtctcc

39

25 <210> 12

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<221> fuente

<222> 1..49  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="primer" /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 12  
 5 gaattcgcgg ccgctcatcc ttctactgaa ttgtcacac ttgcattac 49  
  
 <210> 13  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..42  
 15 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="primer" /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 13  
 acgtagatc tcactcagt cctgcattt gttccagta ac 42  
  
 20 <210> 14  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..33  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="primer" /organism="Artificial Sequence"  
  
 30 <400> 14  
 aacgttgcgg ccgctagttt cacaacccc agg 33  
  
 <210> 15  
 <211> 45  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 40 <222> 1..45  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="primer" /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 15  
 45 gaattcaagc ttgccacat gttgcagatg gctgggcagt gctcc 45  
  
 <210> 16  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..48  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="primer" /organism="Artificial Sequence"  
 55  
 <400> 16  
 gaattctcta gattacctag cagaaattga ttctctatc tccgtagc 48  
  
 <210> 17



<211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17

5

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Lys Leu Ser Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100     105     110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 18  
 <211> 119  
 10 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Lys Val Ala Pro Tyr Phe Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100     105     110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

15

<210> 19  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50				55						60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 20

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35				40						45			
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50				55						60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

10

<210> 21

<211> 118

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Lys	Val	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115													

<210> 22

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Lys	Val	Arg	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser												
			115													

10

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 23

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115												

<210> 24

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

10	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70				75						80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Arg	Val	Ser	Phe	Trp	Gly	Ser	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100						105					110		
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115													

<210> 25

<211> 117

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Val	Asn	Phe	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115												

<210> 26

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115				120								

10

<210> 27

<211> 109

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 27

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro
			85						90					95	
Arg	Val	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105							

<210> 28

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Asn	Pro	Pro
			85						90					95	
Leu	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105							

10

<210> 29

<211> 109

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 29

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro

# ES 2 667 420 T3

85 90 95  
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 30  
 <211> 111  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 30

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

10  
 <210> 31  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 31

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro  
 85 90 95  
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

20 <210> 32  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 32

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Phe	Asn	Pro	Pro
				85					90					95	
Ser	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105							

5 <210> 33  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 33

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ala	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105							

<210> 34  
 15 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 34  
 20



```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
      20      25      30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35      40      45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50      55      60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65      70      75      80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro
      85      90      95
Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 109

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 35

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
      20      25      30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

      35      40      45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50      55      60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65      70      75      80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
      85      90      95
Phe Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105

```

10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 36

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala
				85					90					95	
Leu	Thr	Thr	Pro	Thr	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
			100					105					110		

Lys

<210> 37

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser
10	1				5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 38

	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser
20	1				5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 39

	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser
	1				5

30 <210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 40

	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly
	1				5

<210> 41

40 <211> 5

<212> PRT

	<213> Homo sapiens				
	<400> 41				
5		Ser	Tyr	Ala	Met
	<210> 42	1			5
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Homo sapiens				
10	<400> 42				
		Ser	Tyr	Ala	Met
	<210> 43	1			5
15	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Homo sapiens				
	<400> 43				
20		Ser	Tyr	Ala	Met
	<210> 44	1			5
	<211> 5				
	<212> PRT				
25	<213> Homo sapiens				
	<400> 44				
		Ser	Tyr	Ala	Met
	<210> 45	1			5
30	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Homo sapiens				
35	<400> 45				
		Ser	Tyr	Ala	Met
	<210> 46	1			5
40	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Homo sapiens				
45	<400> 46				
		Ser	Tyr	Ala	Met
	<210> 47	1			5
50	<211> 17				
	<212> PRT				
	<213> Homo sapiens				
	<400> 47				
55					

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 48

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

10

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

20

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 50

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 51

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

35

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 52

<211> 17

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

45

<210> 53  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 53

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

10  
 <210> 54  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 54

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

20 <210> 55  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 55

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 56  
 30 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 56

35  
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 57  
 <211> 9  
 40 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 57

45 Leu Ser Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 58  
 <211> 10

# ES 2 667 420 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58

5

Val	Ala	Pro	Tyr	Phe	Ala	Pro	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 59

<211> 7

10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 59

15

Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr
1				5		

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 60

Asn	Gly	Tyr	Leu	Gly	Asp	Tyr
1				5		

25 <210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 61

Val	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr
1				5				

<210> 62

35 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

40

Val	Arg	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5			

<210> 63

<211> 8

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Val	Ser	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5			

50

<210> 64

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5 <400> 64

Val Ser Phe Trp Gly Ser Leu Val Tyr  
1 5

<210> 65  
10 <211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 65  
15

Val Asn Phe Gly Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 66  
<211> 12  
20 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 66

Ser Tyr Gly Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Phe Asp Tyr  
1 5 10  
25

<210> 67  
<211> 12  
<212> PRT  
30 <213> Homo sapiens  
  
<400> 67

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10  
35

<210> 68  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
40  
<400> 68

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

45 <210> 69  
<211> 12

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 69

5

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 70

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
1 5 10 15

15

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

25

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 72

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

35 <210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 73

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 74

45 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 74

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

5

<210> 75  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

15

<210> 76  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 76

20

<210> 77  
<211> 7  
<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 77

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
1 5 10 15

30

<210> 78  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35

<400> 78

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

40

<210> 79  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45

<400> 79

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 80  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 80

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

10  
  
<210> 81  
<211> 7  
<212> PRT  
15 <213> Mus musculus  
  
<400> 81

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
1 5

20  
<210> 82  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
25  
<400> 82

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

30 <210> 83  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 83  
35

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 84  
<211> 7  
40 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 84

# ES 2 667 420 T3

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 85  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 85

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

10  
  
<210> 86  
<211> 7  
<212> PRT  
15 <213> Homo sapiens  
  
<400> 86

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
1 5

20  
<210> 87  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25  
<400> 87

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Val Thr  
1 5 10

30 <210> 88  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
35 <400> 88

Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro Leu Tyr Thr  
1 5 10

40 <210> 89  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 89  
45

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr  
1 5 10

<210> 90  
<211> 8  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 90

Met Gln Ala Met Gln Ile Pro Thr  
1 5

10  
  
<210> 91  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> Mus musculus  
  
<400> 91

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Ser Phe Thr  
1 5 10

20  
<210> 92  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25  
<400> 92

Gln Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Ser Ile Thr  
1 5 10

30 <210> 93  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
35 <400> 93

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Ala Phe Thr  
1 5 10

<210> 94  
40 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 94  
45

# ES 2 667 420 T3

Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro Leu Phe Thr  
1 5 10

<210> 95  
<211> 10  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 95

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Phe Phe Thr  
1 5 10

10  
  
<210> 96  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> Homo sapiens  
  
<400> 96

Met Gln Ala Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Thr  
1 5 10

20

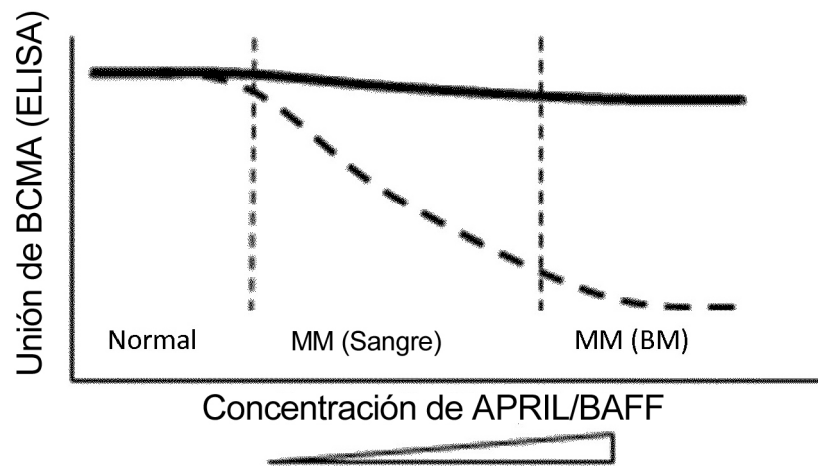
## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos objetivos: CD3ε humano y antígeno de maduración de la célula B humana (BCMA), el anticuerpo biespecífico comprende:
  - (a) un primer fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a BCMA (primer fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA);
  - (b) un segundo fragmento Fab del anticuerpo que se une específicamente a BCMA (segundo fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA);
  - (c) una parte Fc; y
  - (d) un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente a CD3ε (fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3ε), en el que los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH1 del fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3ε son reemplazados el uno por otro,
- en el que el primer fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA se une a través de su extremo C al extremo N de la región bisagra de la parte Fc, el fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3ε se une mediante su extremo C al extremo N de la región bisagra de la parte Fc, y el segundo fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA se une químicamente a través de su extremo C al extremo N del fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3ε.
2. Anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, en el que el fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3ε comprende un VH de dominio variable que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada respectivamente y una VL de dominio variable que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 respectivamente como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera.
3. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fragmento Fab del anticuerpo anti-CD3ε comprende los dominios variables de las SEQ ID NOs: 7 y 8.
4. Anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA comprende un dominio variable VH que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 37 a 45, 47 a 55 y 57 a 65 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada respectivamente y un VL de dominio variable que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 67 a 75, 77 a 85 y 87 a 95 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera respectivamente.
5. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA comprende un VH de dominio variable seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 17 a 25 y un VL de dominio variable seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 27 a 35, respectivamente.
6. Anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA comprende un VH de dominio variable que comprende las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 39, 49 y 59 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada respectivamente y una VL de dominio variable que comprende las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOs: 69, 79 y 89 como CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera respectivamente.
7. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento Fab del anticuerpo anti-BCMA comprende un dominio variable VH de SEQ ID NO: 19 y un dominio variable VL de SEQ ID NO: 29.
8. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la parte Fc es una variante Fc de una región Fc IgG1 humana de tipo salvaje, y en la que la variante Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición Pro329 con glicina o arginina y al menos otra sustitución de aminoácido que es L234A o L235A.
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para uso como un medicamento.
11. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición

farmacéutica de la reivindicación 9 para uso como un medicamento en el tratamiento de trastornos de células plasmáticas.

12. El anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la composición  
5 farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el trastorno de células plasmáticas es mieloma múltiple u otro trastorno de células B que expresa BCMA.

**Fig.1**



**Fig. 2**

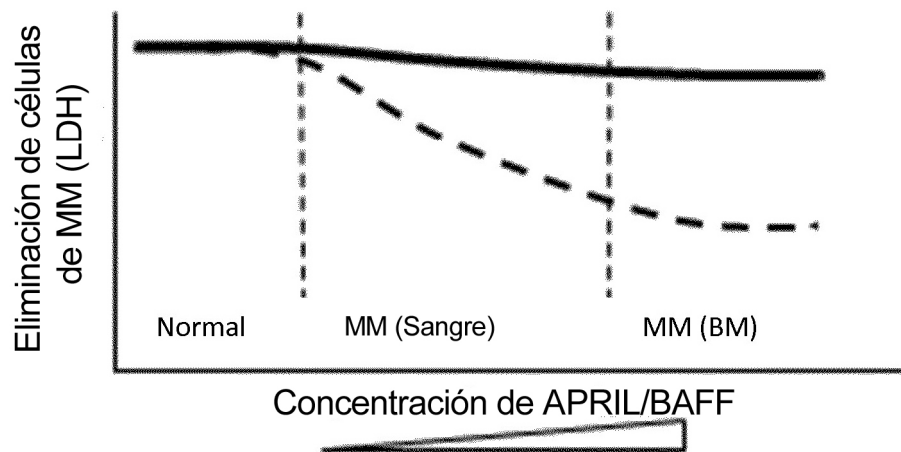




Fig. 3

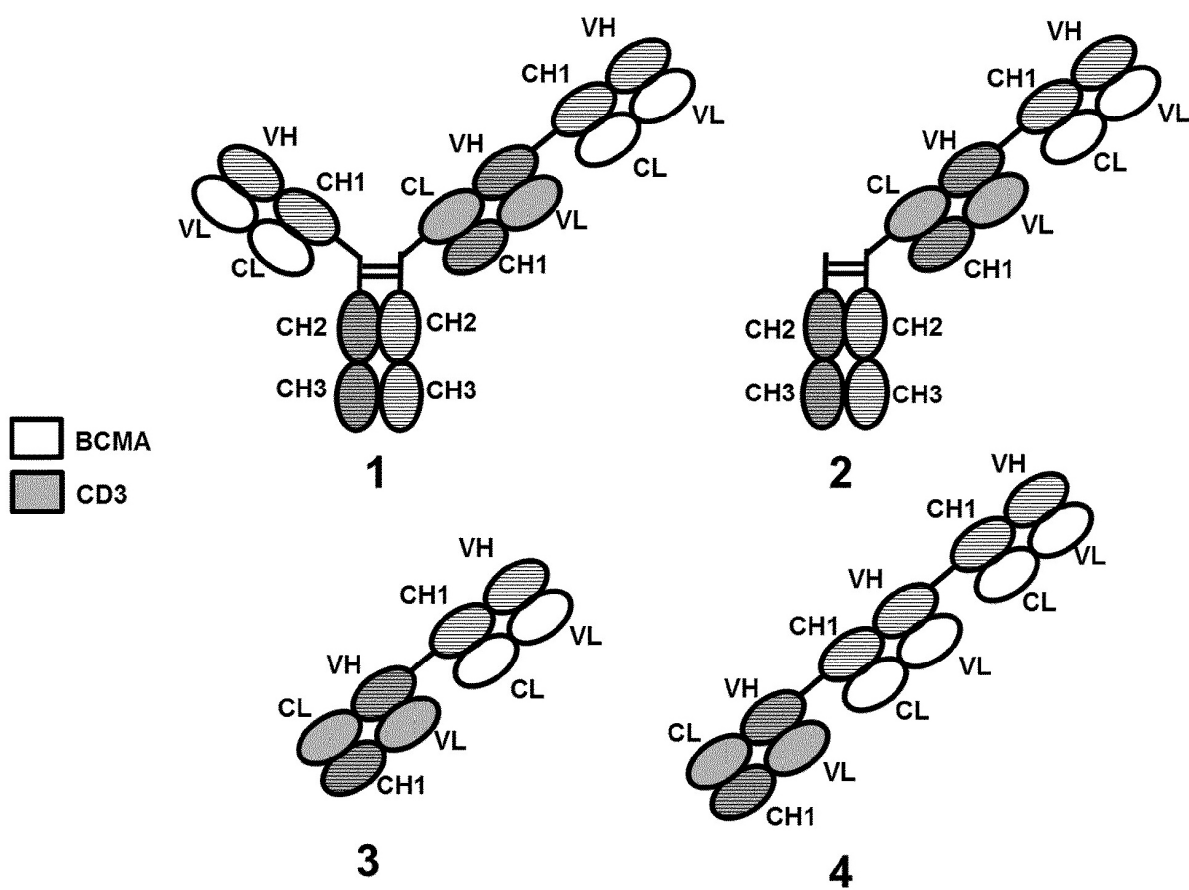
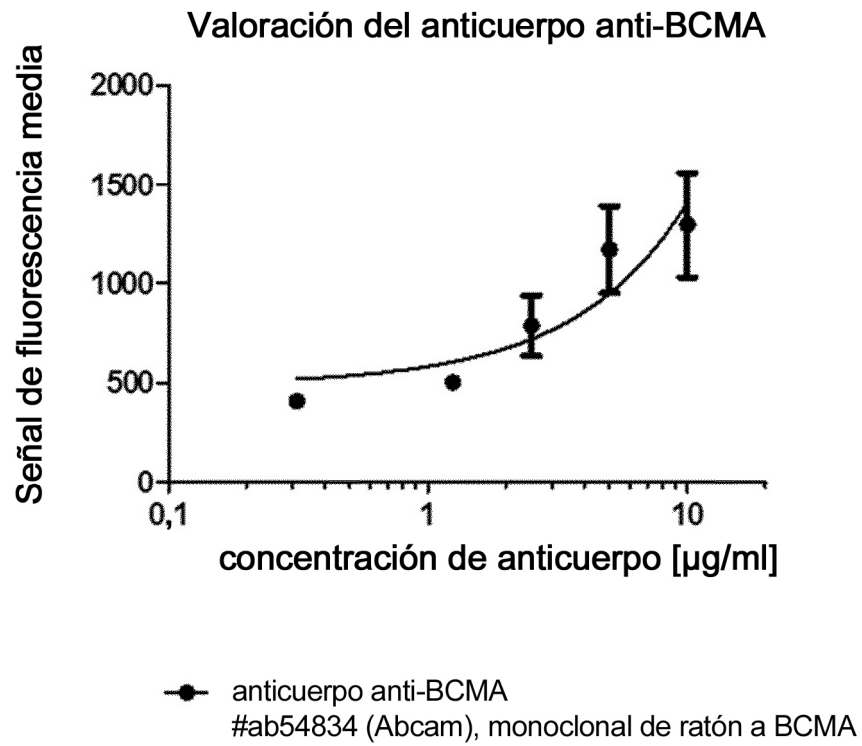
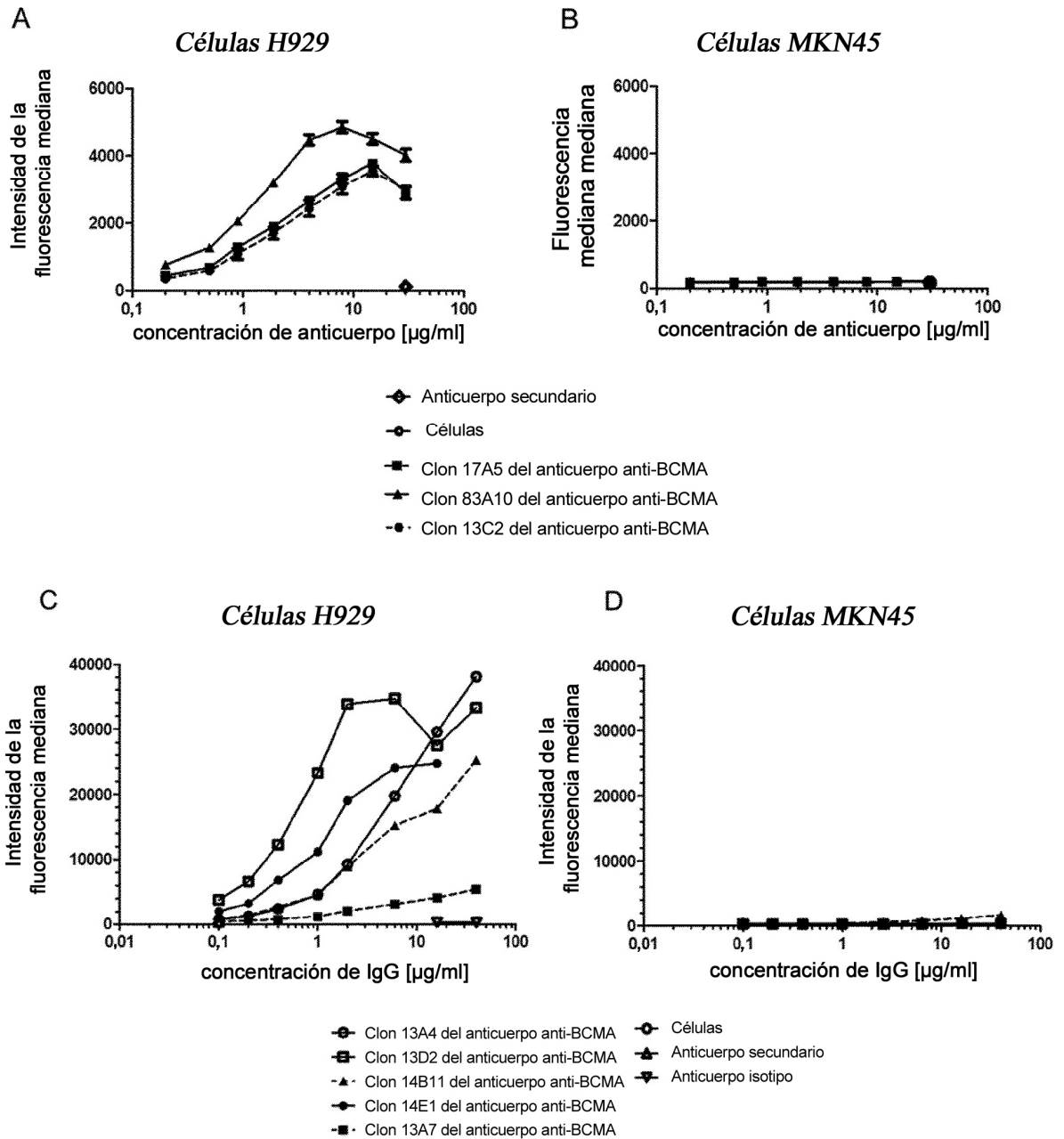


Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**

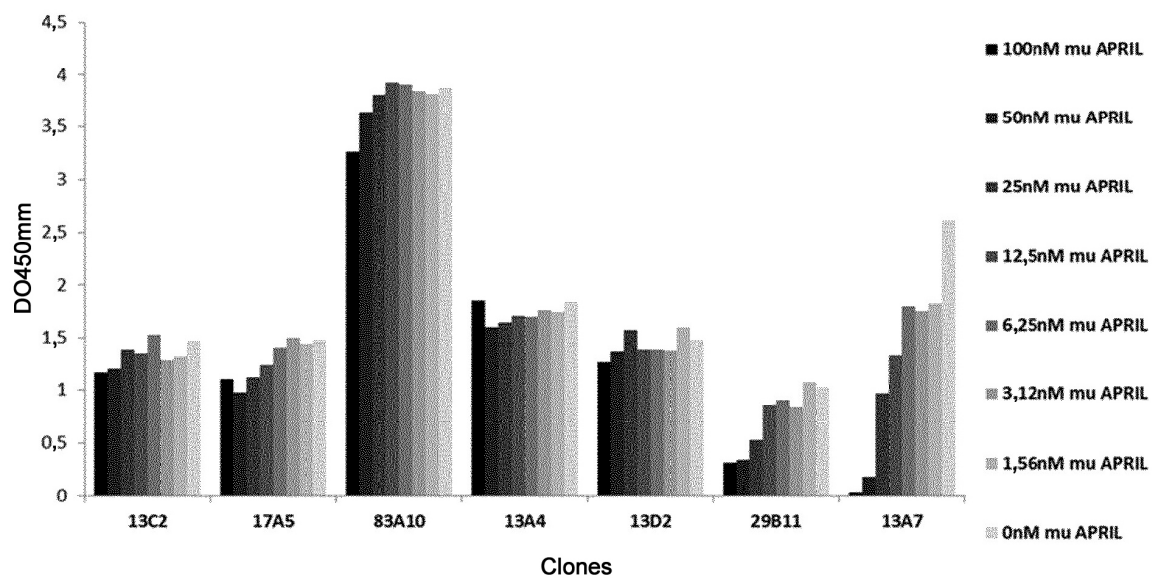


Fig. 7

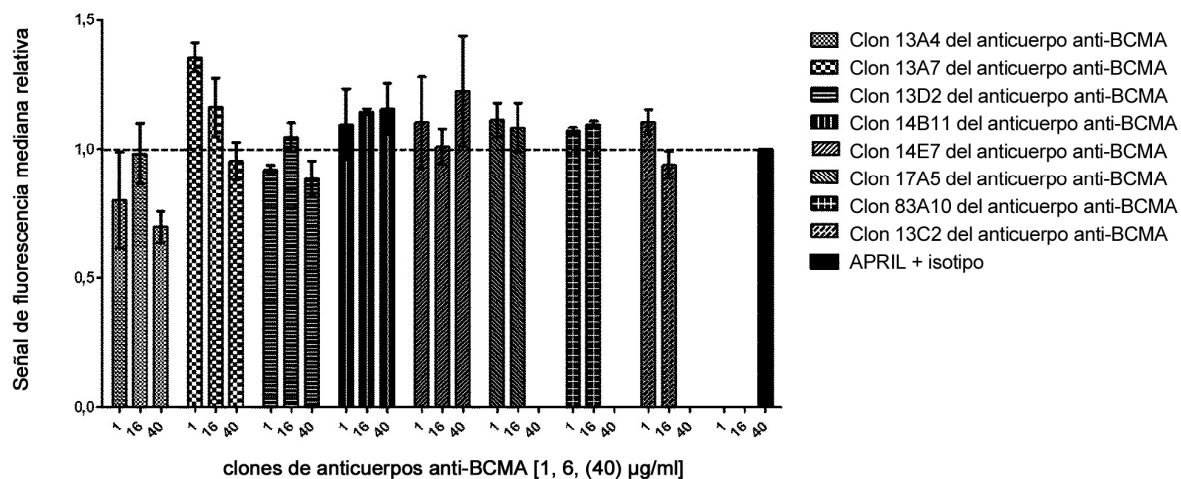


Fig. 8

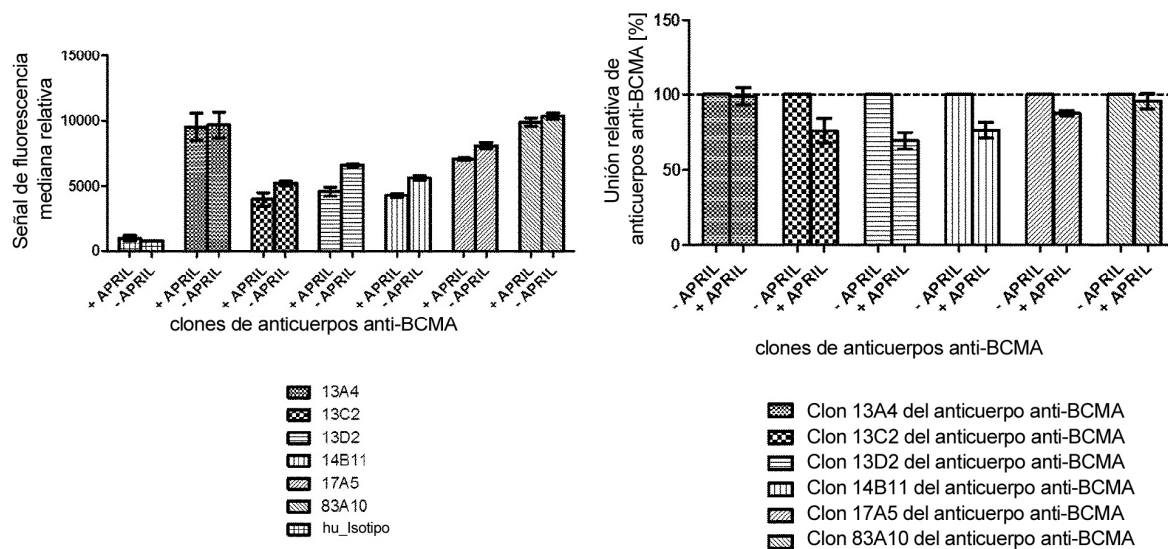


Fig. 9

