

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 873 846**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01) **A61P 35/02** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) **A61P 37/04** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2016 PCT/US2016/062748**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17087789**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2016 E 16867215 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **12.03.2025 EP 3377103**

(54) Título: **Complementación de fragmento de anticuerpo funcional para un sistema de dos componentes para eliminación redirigida de células no deseadas**

(30) Prioridad:

19.11.2015 US 201562257552 P
22.12.2015 US 201562270907 P

(73) Titular/es:

REVITOPE LIMITED (100.00%)
Angel Building, 407 St. John Street
London EC1V 4AD, GB

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
23.06.2025

(72) Inventor/es:

COBBOLD, MARK

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

DESCRIPCIÓN

Complementación de fragmento de anticuerpo funcional para un sistema de dos componentes para eliminación redirigida de células no deseadas

5

Campo

La presente solicitud se refiere a agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos para tratar una afección caracterizada por la presencia de células no deseadas. En particular, se refiere a agentes que se pueden usar para tratar una afección caracterizada por la presencia de células no deseadas, tales como cáncer u otras células que causan enfermedades.

10

Antecedentes

15 El cáncer y otras enfermedades causadas por la presencia de células no deseadas crean una pérdida significativa de vidas, sufrimiento e impacto económico. Las estrategias inmunoterapéuticas para dirigirse al cáncer han sido un área activa de investigación clínica traslacional.

20 Una variedad de enfoques se ha explorado para inmunoterapia, pero muchos de estos enfoques anteriores carecen de suficiente especificidad para determinadas células no deseadas. Por ejemplo, se han diseñado semicuerpos, cada uno con una porción de scFv que se une a diferentes抗igenos en una célula diana, un dominio Fc que permite el emparejamiento con un semicuerpo complementario y una pareja de unión capaz de formar una asociación con otra pareja de unión en un semicuerpo complementario. Documento de patente WO 2007/062466. Sin embargo, estos semicuerpos no son necesariamente específicos para células cancerosas y podrían unirse y tener actividad en otras células que expresan los mismos抗igenos. Véase también el documento de patente WO 2013/104804, que proporciona un primer polipéptido con un resto de direccionamiento que se une a un primer抗igeno y un primer fragmento de un dominio funcional, junto con un segundo polipéptido con un resto de direccionamiento que se une a un segundo抗igeno y un segundo fragmento de un dominio funcional que es complementario al primer fragmento del dominio funcional. Del mismo modo, este enfoque no es necesariamente específico para células cancerosas y podría unirse y tener actividad en otras células que expresan los mismos抗igenos.

25 Aunque con enfoques anteriores se han mostrado algunos datos de ensayo positivos, las estrategias terapéuticas clínicamente eficaces deben ser capaces de provocar una respuesta inmunitaria fuerte en un individuo que padece una enfermedad tal como cáncer. Además, las terapias eficaces deberían ser muy específicas y no causar efectos secundarios no deseados a otros tipos de células del organismo. El documento de patente US 2015/0183875 se refiere a una molécula que comprende: (i) un resto de direccionamiento capaz de dirigirse directa o indirectamente a células no deseadas, y (ii) un resto adicional que tiene una región de unión de células inmunitarias enmascarada para evitar la unión del resto adicional a una célula inmunitaria, en donde la región de unión de la célula inmunitaria enmascarada es capaz de desenmascararse de forma selectiva cuando la molécula está en las proximidades de las células no deseadas para permitir la unión del resto adicional a una célula inmunitaria. El documento de patente WO 2015/013671 se refiere a anticuerpos multiespecíficos y a anticuerpos activables multiespecíficos que se unen específicamente a dos o más抗igenos o epítopos diferentes, así como a métodos para fabricar y usar estos anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos activables multiespecíficos en una variedad de indicaciones terapéuticas, de diagnóstico y profilácticas. En este campo de la inmunoterapia redirigida se requieren desarrollos adicionales.

30

Sumario

45 La invención reivindicada en la actualidad es como se define en las reivindicaciones. Para evitar dudas, en la medida en la que materia objeto que no entra dentro de la invención reivindicada en la actualidad se mencione en el presente documento, se incluye simplemente con fines de referencia. De acuerdo con la descripción, los inventores describen un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido para tratar una afección caracterizada por la presencia de células no deseadas. Este agente incluye (a) un resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a las células no deseadas; (b) un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad cuando se une a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no es parte del agente; (c) al menos una pareja de unión inerte capaz de unirse al primer dominio de unión a linfocitos T de modo que el primer dominio de unión a linfocitos T no se una al segundo dominio de unión a linfocitos T a menos que se retire la pareja de unión inerte; y (d) al menos un sitio de escisión que separa el primer dominio de acoplamiento de linfocitos células T y la pareja de unión inerte.

50 En el presente documento se desvela un sistema de dos componentes para tratar una afección caracterizada por la presencia de células no deseadas, comprendiendo el sistema de dos componentes un primer componente que comprende un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido que comprende:

55

- a. un primer componente que comprende un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido que comprende:
 - i. un primer resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a las células no deseadas;

- ii. un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T cuando se une a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no es parte del primer componente;
- 5 iii. una primera pareja de unión inerte para el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T que se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T de modo que el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T no se une al segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la pareja de unión inerte; y
- iv. un sitio de escisión que separa el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y la primera pareja de unión inerte, en donde el sitio de escisión:
- 10 (1) se escinde mediante una enzima expresada por las células no deseadas;
- (2) se escinde por medio de una reacción de escisión sensible al pH dentro de la célula no deseada;
- (3) se escinde mediante una reacción de escisión dependiente de complemento; o
- (4) se escinde mediante una proteasa que está colocalizada en la célula no deseada mediante un resto de direccionamiento que es igual o diferente al resto de direccionamiento en el agente,
- 15 b. un segundo componente que comprende un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T cuando se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T son capaces de unirse cuando ninguno está unido a una pareja de unión inerte.
- 20 En un primer aspecto de la invención, el sistema de dos componentes es un kit o composición para uso en el tratamiento de cáncer, en donde el kit o composición comprende
- 25 a. un primer componente que comprende un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido que comprende:
- i. un primer resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a células cancerosas en donde el primer resto de direccionamiento es un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo;
- ii. un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T cuando se une a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no es parte del primer componente, y en donde el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH o VL;
- 30 iii. una primera pareja de unión inerte para el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T que se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T de modo que el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T no se une al segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la primera pareja de unión inerte en donde, si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH, la primera pareja de unión inerte es un dominio VL y, si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, la primera pareja de unión inerte es un dominio VH; y
- 35 iv. un primer sitio de escisión de proteasa que separa el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y la primera pareja de unión inerte, en donde el primer sitio de escisión de proteasa es capaz de liberar la primera pareja de unión inerte del dominio de acoplamiento de linfocitos T en presencia de una proteasa expresada por las células cancerosas,
- 40 b. un segundo componente que comprende un agente de acoplamiento a linfocitos T dirigido que comprende:
- 45 i. un segundo resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a células cancerosas en donde el segundo resto de direccionamiento es un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo;
- ii. un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T cuando se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T, cuando se emparejan entre sí, son capaces de unirse a CD3 o al receptor de linfocitos T (TCR) cuando ninguno está unido a una pareja de unión inerte y además en donde si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH, el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, y si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH;
- 50 iii. una segunda pareja de unión inerte para el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T que se une al segundo dominio de segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T de tal manera que el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la segunda pareja de unión inerte, en donde si el segundo dominio de unión a linfocitos T es un dominio VH, la segunda pareja de unión inerte es un dominio VL y si el segundo dominio de unión a linfocitos T es un dominio VL, la segunda pareja de unión inerte es un dominio VH; y
- 55 iv. un segundo sitio de escisión de proteasa que separa el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T y la segunda pareja de unión inerte, en donde el segundo sitio de escisión de proteasa es capaz de liberar la segunda pareja de unión inerte del segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T en presencia de una proteasa expresada por las células cancerosas,
- 60 65 en donde la escisión del segundo sitio de escisión de proteasa causa la pérdida de la segunda pareja de unión inerte y la complementación con el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T del kit o la composición.

En otra divulgación, el segundo componente del sistema de dos componentes además comprende un segundo resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a las células no deseadas.

5 En otra divulgación, el segundo componente del sistema de dos componentes además comprende una segunda pareja de unión inerte para el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T que se une al segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T de modo que el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la pareja de unión inerte y

10 a. un sitio de escisión que separa el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T y la segunda pareja de unión inerte, en donde el sitio de escisión:

- i. se escinde mediante una enzima expresada por las células no deseadas;
- ii. se escinde por medio de una reacción de escisión sensible al pH dentro de la célula no deseada;
- iii. se escinde mediante una reacción de escisión dependiente de complemento; o

15 iv. se escinde mediante una proteasa que está colocalizada en la célula no deseada mediante un resto de direccionamiento que es igual o diferente al resto de direccionamiento en el agente,

en donde la escisión del sitio de escisión causa la pérdida de la pareja de unión inerte y complementación con el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T del sistema de dos componentes.

20 En algunas realizaciones, el primer y el segundo restos de direccionamiento del sistema de dos componentes son iguales.

25 En algunas realizaciones, el primer y el segundo restos de direccionamiento del sistema de dos componentes son diferentes.

El primer y el segundo sitios de escisión pueden ser iguales.

El primer y el segundo sitios de escisión pueden ser diferentes.

30 Se desvela en donde al menos un sitio de escisión es un sitio de escisión de proteasa. El al menos un sitio de escisión puede ser capaz de escisión fuera de las células no deseadas.

35 También se desvela en donde al menos una enzima expresada por las células no deseadas es una proteasa.

También se desvela en donde al menos una pareja de unión inerte se une específicamente al dominio de acoplamiento de linfocitos T.

40 En una divulgación del sistema de dos componentes, al menos una pareja de unión inerte es un dominio VH o VL.

45 El primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH y la primera pareja de unión inerte es un dominio VL, y cuando el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, la primera pareja de unión inerte es un dominio VH. El segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH y la segunda pareja de unión inerte es un dominio VL, y cuando el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, la segunda pareja de unión inerte es un dominio VH.

Se desvela en donde al menos un resto de direccionamiento es un anticuerpo o fragmento funcional del mismo.

50 En un segundo aspecto de la invención, un conjunto de moléculas de ácido nucleico codifica el primer y el segundo componentes del primer aspecto de la invención. También se desvela en donde una molécula de ácido nucleico codifica el componente para uso en un sistema de dos componentes.

55 En algunas realizaciones de la invención, un dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH y el otro dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL.

En otra divulgación, un componente para uso en un sistema de dos componentes para tratar una afección caracterizada por la presencia de células no deseadas que comprende un primer agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido comprende:

60 a. un resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a las células no deseadas;

b. un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T cuando se une a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no es parte del primer agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido;

c. una pareja de unión inerte para el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T que se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T de modo que el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T no se une al segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la pareja de unión inerte; y

d. un sitio de escisión que separa el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y la pareja de unión inerte, en donde el sitio de escisión:

- i. se escinde mediante una enzima expresada por las células no deseadas;
- ii. se escinde por medio de una reacción de escisión sensible al pH dentro de la célula no deseada;
- iii. se escinde mediante una reacción de escisión dependiente de complemento; o

5 se escinde mediante una proteasa que está colocalizada en la célula no deseada mediante un resto de direcciónamiento que es igual o diferente al resto de direcciónamiento en el agente, en donde la escisión del sitio
10 de escisión causa la pérdida de la pareja de unión inerte y permite complementación con el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T que no es parte del agente.

15 También se desvela un método para tratar en un paciente una enfermedad caracterizada por la presencia de células no deseadas, método que comprende administrar al paciente el sistema de dos componentes desvelado. También se desvela un método para dirigir una respuesta inmunitaria de un paciente a células no deseadas, método que comprende administrar el sistema de dos componentes desvelado. Estas células no deseadas pueden ser células cancerosas. El cáncer puede ser uno cualquiera de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer renal, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer cerebral, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, leucemia, mieloma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, leucemia
20 linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, trastorno linfoproliferativo, trastorno mielodisplásico, enfermedad mieloproliferativa o enfermedad premaligna.

25 Los objetos y ventajas adicionales se presentarán en parte en la descripción que sigue a continuación, y en parte serán evidentes a partir de la descripción, o se pueden aprender con la práctica. Los objetos y ventajas de la invención se realizarán y alcanzarán por medio de los elementos y combinaciones de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

30 Se debe entender que tanto la descripción general mencionada anteriormente como la descripción detallada que sigue a continuación son únicamente a modo de ejemplo y explicativas y no limitan las reivindicaciones.

35 **Breve descripción de los dibujos**
40 Los dibujos adjuntos, que se incorporan y forman parte de la presente memoria descriptiva, ilustran una (varias) realización o realizaciones y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios que se describen en el presente documento.

45 La Figura 1 muestra un ejemplo de un primer componente de un sistema de dos componentes, donde el primer componente es un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido en un estado inactivo con una pareja de unión inerte.
50 La Figura 2 muestra el proceso mediante el cual se escinde el conector escindible y la pareja de unión inerte se libera para crear una entidad activa.
55 La Figura 3 ilustra la creación de un agente de acoplamiento de linfocitos T, dirigido activo después de liberar la pareja de unión inerte de un par de componentes complementarios en un sistema de dos componentes.
60 Las Figuras 4A-C ilustran la escisión del proceso por etapas del par de componentes complementarios en un sistema de dos componentes que se unen a la célula diana (A), la escisión del conector que une las parejas de unión inertes (A y B) y la unión para crear un resto activo competente de linfocitos T.
65 Las Figuras 5A-B proporcionan la evaluación de los constructos mediante SDS PAGE y tinción con azul de Coomassie.
70 La Figura 6 muestra la expresión de FNy como una aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas se trataron con diversos constructos y combinaciones individuales, con 6245 sirviendo como control positivo y la combinación de 6248 y 6249 mostrando resultados beneficiosos.
75 La Figura 7 muestra la expresión de FNy como aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas se trataron con diversos constructos y combinaciones individuales, con 6245 como control positivo y la combinación de 6248 y 6249 mostrando resultados beneficiosos.
80 La Figura 8 muestra la expresión de FNy como aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas se trataron con diferentes concentraciones de constructos, con 6245 como control positivo y la combinación de 6248 y 6249 mostrando resultados beneficiosos.
85 Las Figuras 9A-B muestran la expresión de FNy como aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas se trataron con controles o diferentes concentraciones de constructos, con 6245 como control positivo y la combinación de 6248 y 6249 mostrando resultados beneficiosos. PHA también sirvió como control positivo para la activación inespecífica de linfocitos T.
90 La Figura 10 muestra la expresión de FNy como aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas se trataron con controles o diferentes concentraciones de constructos, con niveles muy bajos de los constructos que tienen solo un VH o VL para el scFv anti-CDE3, pero los constructos biespecíficos de control positivo (tanto 9332 como 9333) mostraron niveles de actividad más altos.
95 La Figura 11 proporciona una evaluación estequiométrica de constructos complementarios de un sistema de dos

componentes.

La Figura 12 muestra la expresión de FNy como aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas MCF-7 se trataron con controles o diferentes concentraciones de constructos.

5 La Figura 13 muestra la expresión de FNy como aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas se trataron con controles o diferentes concentraciones de constructos que se dirigen a EpCAM.

La Figura 14 muestra la expresión de FNy como aproximación para la respuesta de los linfocitos T cuando las células cancerosas se trataron con controles o diferentes concentraciones de constructos que se dirigen a epítopos de EGFR biparatópicos o una combinación de direccionamiento de EpCAM y EGFR.

10 La Figura 15 muestra el impacto de los inhibidores de proteasa en constructos que contienen sitios de escisión de proteasa o que no contienen sitios de escisión de proteasa.

La Figura 16 muestra que se pueden usar diferentes tipos de restos de dirección, emparejando de forma satisfactoria un constructo que tiene un resto de dirección de VHH con un constructo que tiene un resto de scFv.

15 La Figura 17 muestra un esquema de secuencias para los constructos 6248 y 6249 con los diversos conectores encuadrados y el sitio de escisión de proteasa en negrita y subrayado. La etiqueta His también está en negrita.

Descripción de las secuencias

Las Tablas 1A y 1B proporcionan un listado de ciertas secuencias a las que se hace referencia en el presente documento.

Tabla 1A: Descripción de las Secuencias y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	Nº.
Sitio de escisión de ADAM28	KPAKFFRL	1
Sitio de escisión de ADAM28	DPAKFFRL	2
Sitio de escisión de ADAM28	KPMKFFRL	3
Sitio de escisión de ADAM28	LPAKFFRL	4
Sitio de escisión de ADAM28	LPMKFFRL	5
Sitio de escisión de ADAM28	KPAMFFRL	6
Sitio de escisión de ADAM28	YPAKFFRL	7
Sitio de escisión de ADAM28	KWAKFFRL	8
Sitio de escisión de ADAM28	DPMKFFRL	9
Sitio de escisión de ADAM28	DPAMFFRL	10
Sitio de escisión de ADAM28	DPMMFFRL	11
Sitio de escisión de ADAM28	KMAMFFRL	12
Sitio de escisión de ADAM28	KMAMFFIM	13
Sitio de escisión de ADAM28	KPAMFFIM	14
Sitio de escisión de ADAM28	LPAMFFRL	15
Sitio de escisión de ADAM28	LPMMFFRL	16
Sitio de escisión de ADAM28	LMAMFFRL	17
Sitio de escisión de ADAM28	LMAMFFIM	18
Sitio de escisión de ADAM28	LPAMFFIM	19
Sitio de escisión de ADAM28	LPAMFFYM	20
Sitio de escisión de ADAM28	KPMMFFRL	21
Sitio de escisión de ADAM28	KPAKFFYM	22
Sitio de escisión de ADAM28	KPAKFFIM	23
Sitio de escisión de ADAM28	IPMKFFRL	24

(continuación)

Tabla 1A: Descripción de las Secuencias y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	Nº.
Sitio de escisión de ADAM28	IPAMFFRL	25
Sitio de escisión de ADAM28	IPMMFFRL	26
Sitio de escisión de ADAM28	IMAMFFRL	27
Sitio de escisión de ADAM28	IMAMFFIM	28
Sitio de escisión de ADAM28	IPAMFFIM	29
Sitio de escisión de ADAM28	IPAMFFYM	30
Sitio de escisión de catepsina B	FR	31
Sitio de escisión de catepsina B	FK	32
Sitio de escisión de catepsina B	VA	33
Sitio de escisión de catepsina B	VR	34
Sitio de escisión de catepsina B	V{Cit}	35
Sitio de escisión de catepsina B	HLVEALYL	36
Sitio de escisión de catepsina B	SLLKSRMVPNFN	37
Sitio de escisión de catepsina B	SLLIARRMPNFN	38
Sitio de escisión de catepsina B	KKFA	39
Sitio de escisión de catepsina B	AFKK	40
Sitio de escisión de catepsina B	QQQ	41
Sitio de escisión de catepsina D	PRSFFRLGK	42
Sitio de escisión de catepsina D	SGVVIATVIVIT	43
Sitio de escisión de catepsina K	GGP	44
Sitio de escisión de MMP1	SLGPQGIWGQFN	45
Sitio de escisión de MMP2	AIPVSLR	46
Sitio de escisión de MMP2	SLPLGLWAPNFN	47
Sitio de escisión de MMP2	HPVGLLAR	48
Sitio de escisión de MMP2	GPLGVRGK	49
Sitio de escisión de MMP2	GPLGLWAQ	50
Sitio de escisión de MMP3	STAVIVSA	51
Sitio de escisión de MMP7	GPLGLARK	52
Sitio de escisión de MMP7	RPLALWRS	53
Sitio de escisión de MMP7	SLRPLALWRSFN	54
Sitio de escisión de MMP2/9	GILGVP	55
Sitio de escisión de MMP2/9	GPLGIAGQQ	56
Sitio de escisión de MMP9	AVRWLLTA	57
Sitio de escisión de MMP9	PLGLYAL	58
Sitio de escisión de MMP9	GPQGIAGQR	59
Sitio de escisión de MMP9	KPVSLSYR	60
Sitio de escisión de MMP11	AAATSIAM	61

(continuación)

Tabla 1A: Descripción de las Secuencias y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	Nº.
Sitio de escisión de MMP11	AAGAMFLE	62
Sitio de escisión de MMP13	GPQGLAGQRGIV	63
Sitio de escisión de MMP14	PRHLR	64
Sitio de escisión de MMP14	PQGLLGAPGILG	65
Sitio de escisión de MMP14	PRSAKELR	66
PSA / KLK3	HSSKLQ	67
PSA / KLK3	SSKLQ	68
KLK4	RQQR	69
TMPRSS2	GGR	70
Legumaína	AAN	71
ST14 (Matriptasa)	QAR	72
Sitio de escisión de C1s	YLGRSYKV	73
Sitio de escisión de C1s	MQLGRX	74
Sitio de escisión de MASP2	SLGRKIQI	75
Sitio de escisión de C2a y Bb	GLARSNLDE	76
Sitio de escisión de uPa	TYRSRSRYL	77
Sitio de escisión de uPa	KKSPGRVVGGSV	78
Sitio de escisión de uPa	NSGRAVTY	79
Sitio de escisión de uPa	AFK	80
Activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA)	GGSGQRGRKALE	81
ADAM10	PRYEAYKMGK	82
ADAM12	LAQAF	83
ADAM17	EHADLLAVVAK	84
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GGGGS	85
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GGGS	86
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GS	87
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GSGGS	88
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GGSG	89
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GGSGG	90
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GSGSG	91
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GSGGG	92
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GGGSG	93

(continuación)

Tabla 1A: Descripción de las Secuencias y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	Nº.
Conejero de aminoácido flexible (se puede presentar de forma repetida)	GSSSG	94
Aptámero anti-EGFR (aglutinante firme con Kd = 2,4 nM)	UGCCGCUAUAAAUGCACGGAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	95
Aptámero anti-EGFR	UGGCGCUAAAUAUGCACGGAAAUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	96
Aptámero anti-EGFR	UGCUAGUAAAUCGCACGGAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	97
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCCAUAAUCACACGGAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	98
Aptámero anti-EGFR	UUCCGCUGUAAAACACGGACUUAAUCGC CGUAGUAAAAGCAUGUCAAAGCCG	99
Aptámero anti-EGFR	UGUCGCUCUAAAUGCACGGAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	100
Aptámero anti-EGFR	UGCUGCUUUAUCCCACAUAAAUUUUUCC CUCAUAACAUAUJUCUCCCCC	101
Aptámero anti-EGFR	UGCNCGCUAUAAUCGCNCGUAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCNANGCCG	102
Aptámero anti-EGFR	UGCAAAGAAAACGCACGUUUUAAUCGC CGUAGUAAAAGCAUGUCAAAGCCG	103
Aptámero anti-EGFR	UGCAUCACUAUCGAACCUCUUUAAUCCA CCAAAAUAUJUGCAAGGUCCAUACUC	104
Aptámero anti-EGFR	UGCCNNAAUAAACACACNUAUAAAUCGC CGUACAAAUCAGUCAAANCCG	105
Aptámero anti-EGFR	UGCAGCUGUAAAUGCACGUUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	106
Aptámero anti-EGFR	UUCCGAUAAAUCCCGCGUACUAAAUCACC AUAGUCAACAAUUUCCCAACCUC	107
Aptámero anti-EGFR	UCCACUUAUACACACGUUUUAAUCGCC GUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	108
Aptámero anti-EGFR	UCCCUCAACCUUCGCUACUUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCU	109
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCUUAUAAUCACACGGAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	110
Aptámero anti-EGFR	AGCCCCUAGAACACACGGAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	111
Aptámero anti-EGFR	UGCCAAUUAUAAAACACGGAUUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	112

(continuación)

Tabla 1A: Descripción de las Secuencias y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	Nº.
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCUAUAGCGCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	113
Aptámero anti-EGFR	UGCAGAUUAUAGUCACUCAUUAAUCCCC GUAUAAAAACAUACUAAGCUC	114
Aptámero anti-EGFR	UGUAGCUGUAUUGCACACAUUAAUCGC CGUAGUAAAGCAUGUCAAAGCCG	115
Aptámero anti-EGFR	UACCAAUAUACGCCACACAUUAAUCGC GUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	116
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCUAUGCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAACAUGUCAAAGUCG	117
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCUAUUJUAGCACGGAUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	118
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCUAUUUAGCACGGAUUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCNAAGCCG	119
Aptámero anti-EGFR	UGUAGUAAU AUGACACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCANGUCAAAGCCU	120
Aptámero anti-EGFR	UGUCGCCAUUJACGCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	121
Aptámero anti-EGFR	UGCCCCAAACUACACAAUUAUCGC CGUAUAAAAGCAUGUCAAAGCCG	122
Aptámero anti-EGFR	UGCACUAUCUCACACGUACUAUCGCCG UUAAAAAGCAUGUCAAAGCCG	123
Aptámero anti-EGFR	UGUCGCAAUAUACACUAAUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	124
Aptámero anti-EGFR	UGCAACAAUUAUGCACGUAUUUAUCGC CGUAGUAAAGCAUGUCAAAGAGG	125
Aptámero anti-EGFR	CUACCACAAUCCCACAUUUAUCUC CCAAUCAAAUCUUGGUCCAUUCCC	126
Aptámero anti-EGFR	UGCCCUAAACUCACACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	127
Aptámero anti-EGFR	UUGUCGUAUGUCACACGUAUUAAUCGC CGUAUAAAAGCAUGUCAAAGCCG	128
Aptámero anti-EGFR	UUCCGCUAAACACACGGAGAAAUCGC CGUAGUAAAGCAUGUCAAAGCCG	129
Aptámero anti-EGFR	UGCCGAUUAACACGCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	130
Aptámero anti-EGFR	UGCCAUUAACAGCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	131
Aptámero anti-EGFR	UCCAGAAAUAUGCACACAUUUAUCGCC GUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	132

(continuación)

Tabla 1A: Descripción de las Secuencias y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	Nº.
Aptámero anti-EGFR	UCOGCUAAACAAACACGGAUACAUCGCC GUAGAAAAGCAUGGUCCAAGCCG	133
Aptámero anti-EGFR	UGCACUAUCUCACACGUACUAAUCGCC UAUAAAAGCAUGUCAAANNNG	134
Aptámero anti-EGFR	AUNGCNANNNUACACGUAUJNAUCGCC GUAGAAAAGCAUGUCANAGCCG	135
Aptámero anti-EGFR	UGCUGCUAUAUUGCAAUUUUUAAACUA AGUAGAAAACCAUGUACAAAGUCG	136
Aptámero anti-EGFR	UGUCGCCAUAUUUGCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	137
Aptámero anti-EGFR	UGCCGUUUAUACCCACGGAAUUUAACCU CCGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	138
Aptámero anti-EGFR	UGUGAAUUAUAAUCACGGAUUUAUCGC CGUAUAAAAGCNAUGUCAAAGCCG	139
Aptámero anti-EGFR	UGCCGAUAUNNANCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	140
Aptámero anti-EGFR	UGUCACUAAAUGCACGUAAUAAAUCGC CGUAGUAAGCAUGUCAAAGCCG	141
Aptámero anti-EGFR	UGCAACCAUAAAGCACGUAAUAAAUCGC CGUUAUAAAGCAUGUCAAGCCG	142
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCUAUUAGCACGUAAUUAUCGCC GUAGUAAAAGCAUGUCAAGCCG	143
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCUAUAGCACACGGAAUUUAUCG CCGUAGUAAAAGCAUGUCAAAGCCG	144
Aptámero anti-EGFR	UGCAGGUUAUAACNCGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCNAAGCCG	145
Aptámero anti-EGFR	UGCUCCUUAACACACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	146
Aptámero anti-EGFR	UGCCCGUAUJUGCACGGAUUUAUCGCC GUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCGG	147
Aptámero anti-EGFR	ACUCCCUUAUUNGCAACUACAUAAUCGC CGUAAAUAAGCAUGUNCAAGCCG	148
Aptámero anti-EGFR	UGAAGCUAGAUACACACUAAAUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAAAGCCG	149
Aptámero anti-EGFR	UGACUCUUUAUCCCCCGUACAUUAU <u>C</u> A CGAACCAAAGCAUJUACCAUCCCC	150
Aptámero anti-EGFR	UGACGCCUAACACACGUUAUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	151
Aptámero anti-EGFR	UGUCGCAAAUAGCACGUAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	152

(continuación)

Tabla 1A: Descripción de las Secuencias y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	Nº.
Aptámero anti-EGFR	UGAGUGUAUAAUUCACGUAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCCG	153
Aptámero anti-EGFR	UGCACUUAUACGUAGGUACUAAUCGC CCUACAAACUCACUCUAAAACCG	154
Aptámero anti-EGFR	UUACGCACAUAAUCACACGGAAUUUUAUC GCCGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	155
Aptámero anti-EGFR	CCCAUCUGUACUACAGGAUUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	156
Aptámero anti-EGFR	UGCCCAUAAAAGCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	157
Aptámero anti-EGFR	UGCCGCAUAACAUACACAUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCAAAGCC	158
Aptámero anti-EGFR	UGCAACUUAUACGCACGUAGGUAAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCC	159
Aptámero anti-EGFR	UUCCGCUAUAAAGCACGGAAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	160
Aptámero anti-EGFR	UUCCGCUAAGUCACACGAAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	161
Aptámero anti-EGFR	UGUAGCAUAUACACACGUAAUUAUCGC CGUAUUAAGCAUGUCAAAGCCG	162
Aptámero anti-EGFR	UGCCGUUAUUAUCACGGAUUUAUCGC CGUAGAAAAGCAUGUCCAAGCCG	163
Aptámero anti-EGFR	UAACACAUUAUCAAGUAACUUAUCUCC UUAGUAACCAUCUCCAAGCCG	164

Tabla 1B: Descripción de Secuencias de Constructos y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	N.º
Constructo 6245 cadena única; scFv anti-EPCAM [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV8-19*01 (98,00 %)-IGKJ5*01 L126>I (112)) [12.3.9] (1-113) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (114-128) -VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-54*01 (85,90 %)-(IGHD)-IGHJ4*01, S123>T (243)) [8.8.14] (129-248)] -conector de tetraglicil-seril de 5-meros (249-253) -scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (254-372) -conector de 18-meros (373-390) -V-KAPPA (IGKV4-59*01 de <i>Mus musculus</i> (81,70 %)-IGKJ1*01 L124>V (493) [5.3.9] (391-496)] -hexahistidina (497-502) Número de Registro CAS 1005198-65-1 ChemID: 1005198-65-1	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEI KGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAEL VRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYF CARLRNWDEPMWDQGQGTTVSSGGGG SDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSR GYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMEL SSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTVTVSSGEGTSTGSGGGGGADHH HHHH	165
Constructo 6246 cadena única; scFv anti-EPCAM [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV8-19*01 (98,00 %)-IGKJ5*01 L126>I (112)) [12.3.9] (1-113) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (114-128) -VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-54*01 (85,90 %)-(IGHD)-IGHJ4*01, S123>T (243)) [8.8.14] (129-248)] -conector de tetraglicil-seril de 5-meros (249-253) -scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (254-372) conector de 18-meros (373-390) -hexahistidina (391-396)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEI KGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAEL VRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYF CARLRNWDEPMWDQGQGTTVSSGGGG SDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSR GYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMEL SSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTVTVSSGEGTSTGSGGGGGADHH HHHH	166

(continuación)

Tabla 1B: Descripción de Secuencias de Constructos y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	N.º
Constructo 6247 cadena única; scFv anti-EPCAM [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV8-19*01 (98,00 %)-IGKJ5*01 L126>I (112)) [12.3.9] (1-113) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (114-128) -VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-54*01 (85,90 %)-(IGHD)-IGHJ4*01, S123>T (243)) [8.8.14] (129-248)] -conector de tetraglicil-seril de 5-meros (249-253) -anti-CD3E-V-KAPPA (IGKV4-59*01 de <i>Mus musculus</i> (81,70 %)-IGKJ1*01 L124>V (356) [5.3.9] (254-359)]-hexahistidina (360-365)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEI KGGGGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAEL VRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGVVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEFKKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYF CARLRNWDEPMWDYWGQGTTVTVSSGGGG SDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVSYMWNWQQKPGKAPKRWIYDTSKVAS GVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAA TYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKHHHHH H	167
Constructo 6248 cadena única; scFv anti-EPCAM [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV8-19*01 (98,00 %)-IGKJ5*01 L126>I (112)) [12.3.9] (1-113) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (114-128) -VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-54*01 (85,90 %)-(IGHD)-IGHJ4*01, S123>T (243)) [8.8.14] (129-248)] -conector de tetraglicil-seril de 5-meros (249-253) -scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (254-372) conector de 25-meros (373-397 que contiene sitio de escisión de MMP2, AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) -V-KAPPA (V-KAPPA de <i>Homo sapiens</i> de gantenerumab, CAS: 1043556-46-2; 398-505); 87-hexahistidina (506-511)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEI KGGGGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAEL VRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGVVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEFKKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYF CARLRNWDEPMWDYWGQGTTVTVSSGGGG SDVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGY TFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSR GYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMEL SSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTVTVSSGEGTSTGSGAIIPVSLRGSGG SGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYG ASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEI KHHHHHH	168

(continuación)

Tabla 1B: Descripción de Secuencias de Constructos y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	N.º
Constructo 6249 cadena única; scFv anti-EPCAM [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV8-19*01 (98,00 %)-IGKJ5*01 L126>I (112)) [12.3.9] (1-113) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (114-128) -VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-54*01 (85,90 %)-(IGHD)-IGHJ4*01, S123>T (243)) [8.8.14] (129-248)] -conector de tetraglicil-seril de 5-meros (249-253) -scFv anti-CD3E V-KAPPA (IGKV4-59*01 de <i>Mus musculus</i> (81,70 %)-IGKJ1*01 L124>V (493) [5.3.9] (254-359)] conector de 25-meros (360-384 que contiene sitio de escisión de MMP2, AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) -región V de cadena pesada de Ig (clon alfa-MUC1-1, Acceso GenBank S36265; 385-502)-hexahistidina (503-508)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEI KGGGGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAEL VRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQ RPGHGLEWIGDI FPGSGNIHYNEFKKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYF CARLRNWDEPMWDQGTTVTVSSGGGG SDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVAS GVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAA TYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGEGTS TGSGAIPVSLRGSGGGGADDVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHW VRQAPGQGLEWMGWINPNSSGGTNYAQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDFLSGYLDYWGQGTLTVSSH HHHH	169
Constructo 9327 V _H -V _H DV _L de EpCAM cadena única; scFv anti-EPCAM [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV8-19*01 (98,00 %)-IGKJ5*01 L126>I (112)) [12.3.9] (1-113) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (114-128) -VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-54*01 (85,90 %)-(IGHD)-IGHJ4*01, S123>T (243)) [8.8.14] (129-248)] -conector de tetraglicil-seril de 5-meros (249-253) -scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (254-372) - conector de 25-meros (373-397)-V-KAPPA (V-KAPPA de <i>Homo sapiens</i> de gantenerumab, CAS: 1043556-46-2; 398-505); -hexahistidina (506-511)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEI KGGGGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAEL VRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQ RPGHGLEWIGDI FPGSGNIHYNEFKKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYF CARLRNWDEPMWDQGTTVTVSSGGGG SDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY	170
Secuencia de anti-EpCAM de Brischwein K et al., Mol. Immunol. (2006) 43:1129-43	TFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSR GYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMEL SSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTVTVSSGEGTSTGSGGGGGGGGGGG SGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTTKVEI KHHHHHH	

(continuación)

Tabla 1B: Descripción de Secuencias de Constructos y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	N.º
Constructo 9328 cadena única; scFv anti-EPCAM [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV8-19*01 (98,00 %)-IGKJ5*01 L126>I (112)) [12.3.9] (1-113) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (114-128) -VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-54*01 (85,90 %)-(IGHD)-IGHJ4*01, S123>T (243)) [8.8.14] (129-248)] - conector de tetraglicil-seril de 5-meros (249-253) - scFv anti-CD3E V-KAPPA (IGKV4-59*01 de <i>Mus musculus</i> (81,70 %)-IGKJ1*01 L124>V (493) [5.3.9] (254-359)]-conector de 25-meros (360-384) - región V de cadena pesada de Ig (clon alfa-MUC1-1, Acceso GenBank S36265; 385-502)-hexahistidina (503-508)	ELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTVYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEI KGGGGGGGGGGGGSEVQLLEQSGAEL VRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGVVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIIHYNEKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYF CARLRNWDEPMFYWGQGTTVVSSEGGG SDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVAS GVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAA TYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGEGTS TGSGGGGSGGGGGSGGGADDVQLVQSG AEVKKP GASVKVSCKASGYTFTGYYMHW VRQAPGQGLEWMGWINPNSSGTNYAQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDFLSGYLDYWGQGTLTVSSH HHHH	171
Constructo 9329 V _{HH} -CD3ε de Glipicano 3 (V _H -MMP2-V _L) Secuencia de VHH de Glipicano 3 anti-humano del documento de Patente de Estados Unidos N.º 2012145469; restos 1-116) -conector tris(tetraglicil-seril) de 5-meros (117-122)-scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (123-241) conector de 25-meros (242-266 que contiene sitio de escisión de MMP2, AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) V-KAPPA de <i>Homo sapiens</i> de gantenerumab, CAS: 1043556-46-2; 267-374); -hexahistidina (375-380)	QVQLVQSGGGLVQPGGLRLSCAASYFD FDSYEMSWVRQAPGKGLEWIGSIYHSGS TYYNPSLKSRTVISRDNSKNTLYLQMNT LRAEDTATYYCARVNMDRFDYWGQGTLV TVSSSSGGGSDVQLVQSGAEVKPGASV KVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLE WIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITDK STSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGAI PVSLRGSGGGGADDIVLTQSPATLSLS PGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGT DFTLTISSELEPEDFATYYCLQIYNMPIT FGQGTTKEIKHHHHHH	172

(continuación)

Tabla 1B: Descripción de Secuencias de Constructos y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	N.º
Constructo 9330 anti-[SDC1 de <i>Homo sapiens</i> (sindecano-1, CD138), scFv, de indatuximab CAS: 1238517-16-2, documento de patente de Estados Unidos US20140010828], [V-KAPPA de <i>Mus musculus</i> (IGKV10-94*01-IGKJ1*01) [6.3.9] (1-108) -conector tris(tetraglicil-seril) de 15-meros (109-123) [VH de <i>Mus musculus</i> (IGHV1-9*01 - (IGHD)-IGHJ4*01) [8.8.15] (124-245) -conector tris(tetraglicil-seril) de 5-meros (246-250)-scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (251-369) conector de 25-meros (370-394 que contiene sitio de escisión de MMP2, AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) V-KAPPA de <i>Homo sapiens</i> de gantenerumab, CAS: 1043556-46-2; 395-502); -hexahistidina (503-508)	DIQMTQSTSSLSASLGDRVТИSCSASQG INNYLNWYQQKPDGTVELLIYYTSTLQS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIG TYYCQQYSKLPRTFGGGTKLEIKRGGGG SGGGGGGGGSQVQLQQSGSELMMPGAS VKISCKATGYTFSNYWIEWKQRPGHGL EWIGEILPGTGRTIYNEFKKGKATFTAD ISSNTVQMQLSSLTSEDSAVYYCARRDY YGNFYYAMDYWGQGTSVTVSSGGGSDV QLVQSGAEVKKPGASV рука SCKASGYTFT RYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYT NYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSL RSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTT VTVSSGEGTSTGSGAI PVSLRGSGGSGG ADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS RATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPE DFATYYCLQIYNMPIFGQGTKVEIKHH HHHH	173
Constructo 9332 V _{HH} -CD3ε de EGFR (V _H -V _L) Secuencia de V _{HH} de EGFR anti-humano de la secuencia 7D12 de Schmitz KR et al., Structure. 2 de julio de 2013; 21(7): 1214-24; restos 1-124) -conector tris(tetraglicil-seril) de 30-meros (125-154)-scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (155-273) -conector de 18-meros (274-291)-V-KAPPA (IGKV4-59*01 de <i>Mus musculus</i> (81,70 %)-IGKJ1*01 L124>V (394) [5.3.9] (292-397)] -hexahistidina (398-403) Secuencia de CD3ε anti-humano de Brischwein K et al., Mol. Immunol. (2006) 43:1129-43 documento de patente de Estados Unidos US7919089	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMWFRQAPGKERE FVSGISWRGD STGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYD YWQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGSG GGGSGGGGGSGGGGS DVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG QGLEWIGYINPSRGYT NYADSVKGRFTI TTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCAR YYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTG SGGSGGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSYMWYQQKPGKAPKR WIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLT INSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIKHHHHHH	174

(continuación)

Tabla 1B: Descripción de Secuencias de Constructos y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	N.º
Constructo 9333 V _H -CD3ε de EGFR (V _H -VL) Secuencia de V _H de EGFR anti-humano de la secuencia 9G8 de Schmitz KR et al., Structure. 2 de julio de 2013; 21(7): 1214-24; restos 1-127) -conector tris(tetraglicil-seril) de 30-meros (128-157)-scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (158-276) -conector de 18-meros (277-294)-V-KAPPA (IGKV4-59*01 de <i>Mus musculus</i> (81,70 %)-IGKJ1*01 L124>V(394) [5.3.9] (292-397)] -hexahistidina (401-406)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSYAMGWFRQAPGKEREVVAIWNSSG STYYADSVKGRFTIISRDNAKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDY EYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGS GSGGGGSGGGSGGGSDVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGR FTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYY CARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEQT STGSGGGSGGGADDIVLTQSPATLSLS PGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKA PKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDY SLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFG GGTKVEIKHHHHHH	175
Constructo 9334 V _H -CD3ε de EGFR (V _H -MMP2-V _L) Secuencia de V _H de EGFR anti-humano de la secuencia 7D12 de Schmitz KR et al., Structure. 2 de julio de 2013; 21(7): 1214-24; restos 1-124) -conector tris(tetraglicil-seril) de 30-meros (125-154)-scFv anti-CD3E [VH humanizado (IGHV1-46*01 de <i>Homo sapiens</i> (82,50 %)-(IGHD)-IGHJ6*01) [8.8.12] (155-273) conector de 25-meros (274-298 que contiene sitio de escisión de MMP2, AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) V-KAPPA de <i>Homo sapiens</i> de gantenerumab, CAS: 1043556-46-2; 299-406); -hexahistidina (407-412)	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT SRSYGMGWFRQAPGKEREVSGIISWRGD STGYADSVKGRFTIISRDNAKNTVDLQMN SLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYD YWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSG GGGSGGGGSGGGSDVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG QGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTI TTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCAR YYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEQTSTG SGAIPVSLRGSGGGADDIVLTQSPAT LSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYN MPITFGQGTKVEIKHHHHHH	176

(continuación)

Tabla 1B: Descripción de Secuencias de Constructos y SEQ ID Nos

Descripción	Secuencia	N.º
Constructo 9335 V _{HH} -CD3ε de EGFR (V _L -MMP2-V _H) Secuencia de V _{HH} de EGFR anti-humano de la secuencia 9G8 de Schmitz KR et al., Structure. 2 de julio de 2013; 21(7): 1214-24; restos 1-127) -conector tris(tetraglicil-seril) de 30-meros (128-157)-scFv anti-CD3ε V-KAPPA (IGKV4-59*01 de <i>Mus musculus</i> (81,70 %)-IGKJ1*01 L124>V (493)[5.3.9] (158-263)]-conector de 25-meros (264-288 que contiene sitio de escisión de MMP2, AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) -región V de cadena pesada de Ig (clón alfa-MUC1-1, Acceso GenBank S36265; 289-406)-hexahistidina (307-412)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTE FSSYAMGWFRQAPGKEREFLVVAINWSSG STYYADSVKGRTIISRDNAKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDY EYDYWGQGTQVTVS SGGGGGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGGGGGGGSDIVLTQSPATL SLSPGERATLSCRASQSVDYMNWYQQKE GKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSG TDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPL TFGGGTVKEIKGEGTSTGSGAI PVSLRG SGGSGGADDVQLVQSGAEVKPGASVKV SCKASGYTFTGYYMHWRQAPGQGLEWM GWINPNSSGTNYAQKFQGRVTITRDTS STAYMELSSLRSEDTAVYYCARDFLSGY LDYWGQGTLTVSSHBBBBBB	177

Descripción detallada**I. Sistema de dos componentes que comprende al menos un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido**

5 Se describe una variedad de agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos, que se incluyen como parte de un sistema de dos componentes que comprende un primer componente y un segundo componente. En cada divulgación, sin embargo, se puede usar un resto de direccionamiento para suministrar el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido a una zona de células no deseadas, lo que permite un efecto terapéutico al suministrarse por vía local. El agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido también contiene un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad cuando se une a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T, pero el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no es parte del agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido. En otras palabras, sin el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T que no es parte del agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido, el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T no es capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T. El agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido también comprende una pareja de unión inerte capaz de unirse al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y evitar que se una a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T. En otras palabras, la pareja de unión inerte se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T de modo que el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T no se una al segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la pareja de unión inerte. Al no unirse, la aplicación no excluye la unión no específica o bajos niveles de unión (por ejemplo, < 1 %, < 5 %, < 10 %). El concepto es uno de insuficiencia funcional con la complementación de VH/VL de *novo* suficiente para unirse a diana de linfocitos T. La escisión proteolítica libera los grupos VH o VL inertes permitiendo la oportunidad de volver a emparejar los pares VH y VL activos en la superficie celular. Además, el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido incluye un sitio de escisión que separa el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y la pareja de unión inerte. El sitio de escisión se escinde cuando el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido está en el microentorno de las células no deseadas.

30 El segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T puede ser parte de un segundo agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido. Por lo tanto, un kit o composición puede comprender dos agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos, uno con un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y otro con un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T. En tal kit o composición, las parejas de unión inertes pueden ser capaces de disociación una vez que se ha escindido el sitio de escisión en cada agente; después de la disociación, los dos dominios de acoplamiento de linfocitos T pueden ser capaces de unirse entre sí y exhibir actividad.

35 En divulgaciones con dos agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos, el sistema de dos componentes comprende un dominio de acoplamiento de linfocitos T que puede ser un dominio VH y otro dominio de acoplamiento de linfocitos T que puede ser un dominio VL. En divulgaciones con dos agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos, los restos de direccionamiento en el primer componente y en el segundo componente pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

En divulgaciones con dos agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos, los sitios de escisión en el primer componente y en el segundo componente pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

La Figura 1 muestra un ejemplo de un constructo de agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido que comprende (a) un dominio de direccionamiento de scFv que comprende un dominio VH y un dominio VL que se unen a la diana, en donde el dominio VH y el dominio VL están conectados mediante un conector flexible; (b) un dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo que comprende un dominio VL que se une a un dominio VH inerte, en donde los dominios VH y VL están conectados mediante un conector flexible que tiene un sitio de escisión, y (c) un conector flexible que se une al dominio de direccionamiento y al dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo.

La Figura 2 muestra el proceso mediante el cual se escinde el conector escindible y la pareja de unión inerte se libera para crear una entidad sin una pareja de unión inerte. Esta entidad aún es inactiva porque el dominio VL en el dominio de acoplamiento de linfocitos T no es activo por sí mismo.

La Figura 3 ilustra la creación de un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido después de liberar la pareja de unión inerte de un par de agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos complementarios.

Las Figuras 4A-C ilustran la escisión del proceso por etapas de los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos que se unen a la célula diana (4A), la escisión de las parejas de unión inertes (4A y 4B), y la unión para crear un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido activo (4C).

Alternativamente, el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T puede no estar unido a un resto de direccionamiento y/o puede no comprender un sitio de escisión y una pareja de unión inerte. En algunos casos, el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T puede estar conjugado o unido a un resto de direccionamiento (ya sea un resto de direccionamiento igual o un resto de direccionamiento diferente), pero en la divulgación podría no estar conjugado o unido a una pareja de unión inerte. En tal divulgación, solo el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T está unido a una pareja de unión inerte. En otra divulgación, el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T también puede comprender un resto de direccionamiento, un sitio de escisión, y una pareja de unión inerte, cada uno tal como se describe en el presente documento.

La disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal del primer componente puede comprender IBVL-L1-TCEVH-L2-TVL-L3-TVH. La disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal del segundo componente puede comprender TCEVL-L2-TVH-L3-TVL. La disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal del segundo componente puede comprender IBVH-L1-TCEVL-L2-TBVH-L3-TBVL. En cada uno de estos, IB significa pareja de unión inerte e IBVL es una pareja de unión inerte de VL, mientras que IBVH es un dominio de unión de inserción de VH. TCE significa acoplamiento de linfocitos T y un TCEVL es una porción VL de un dominio de acoplamiento de linfocitos T y un TCEVH es una porción VH de un dominio de acoplamiento de linfocitos T. TB significa dominio de unión a diana y un TBVL es una porción VH de un dominio de unión a diana y un TBVL es una porción de VL de un dominio de unión a diana. L1 es un conector con un sitio de escisión de proteasa, mientras que L2 y L3 son opcionalmente conectores que opcionalmente no se pueden escindir por la misma proteasa que L1.

A. Resto de direccionamiento

El resto de direccionamiento funciona en el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido suministrando el agente al entorno local de las células no deseadas, lo que permite una estrategia de tratamiento localizada. En ciertos casos, el resto de direccionamiento se dirige a las células no deseadas uniéndose específicamente a las células no deseadas. En algunos casos, el resto de direccionamiento se une específicamente a las células no deseadas incluso mientras la pareja de unión inerte se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T.

En algunas divulgaciones, un primer resto de direccionamiento está unido, opcionalmente mediante un conector, a un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y, como parte de un constructo separado, un segundo resto de direccionamiento está unido, opcionalmente mediante un conector, a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T. De esta manera, cada parte complementaria del dominio de acoplamiento de linfocitos T se suministra a las células no deseadas mediante un resto de direccionamiento separado. En algunas divulgaciones, los restos de direccionamiento son del mismo tipo y, en otras, los restos de direccionamiento son diferentes. Cuando los restos de direccionamiento son de diferentes tipos, se pueden dirigir a diferentes epítopos (ya sea superpuestos o no superpuestos) en la misma proteína diana de la célula no deseada o se pueden dirigir a diferentes proteínas diana. En situaciones en las que los restos de direccionamiento se dirigen a diferentes proteínas, la célula no deseada expresará un antígeno que corresponde a cada uno de los dos tipos de restos diana, proporcionando una especificidad adicional para este enfoque.

El resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo o parte funcional del mismo. Por parte funcional, los investigadores se refieren a cualquier fragmento de anticuerpo que conserva su actividad de unión a la diana en la célula no deseada, tal como un scFv o VH u otro fragmento funcional que incluya una inmunoglobulina desprovista de cadenas ligeras, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, fragmento de anticuerpo, diacuerpo, scAB, anticuerpo de cadena pesada

de dominio único, anticuerpo de cadena ligera de dominio único, Fd, regiones CDR o cualquier porción o secuencia peptídica del anticuerpo que sea capaz de unirse al antígeno o epítopo. A menos que se indique específicamente como "anticuerpo de longitud completa", cuando la solicitud se refiere a un anticuerpo, incluye inherentemente una referencia a una parte funcional del mismo.

- 5 Ciertas dianas de anticuerpo (con los ejemplos de tipos de células no deseadas entre paréntesis) pueden incluir: Her2/Neu (neoplasias malignas epiteliales); CD22 (linfocitos B, autoinmunes o malignos); EpCAM (CD326) (neoplasias malignas epiteliales); EGFR (neoplasias malignas epiteliales); PMSA (carcinoma de próstata); CD30 (neoplasias malignas de linfocitos B); CD20 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); cD33 (neoplasias malignas mieloideas); IgE de membrana (linfocitos B alérgicos); receptor de IgE (CD23) (mastocitos o linfocitos B en enfermedades alérgicas), CD80 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); CD86 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); CD2 (linfomas de linfocitos T o linfocitos NK); CA125 (cánceres múltiples, incluyendo carcinoma de ovario); anhidrasa carbónica IX (cánceres múltiples, incluyendo carcinoma de células renales); CD70 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); CD74 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); CD56 (linfomas de linfocitos T o linfocitos NK); CD40 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); CD19 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); c-met/HGFR (neoplasias malignas del tracto gastrointestinal y hepáticas); TRAIL-R1 (neoplasias malignas múltiples incluyendo carcinoma de ovario y colorrectal); DRS (neoplasias malignas múltiples incluyendo carcinoma de ovario y colorrectal); PD-1 (linfocitos B, autoinmunes, alérgicos o malignos); PD1L (neoplasias malignas múltiples incluyendo adenocarcinoma epitelial); IGF-1R (la mayoría de las neoplasias malignas incluyendo adenocarcinoma epitelial); VEGF-R2 (la vasculatura asociada a la mayoría de las neoplasias malignas incluyendo adenocarcinomas epiteliales; antígeno de células madre prostáticas (PSCA) (adenocarcinoma de próstata); MUC1 (neoplasias malignas epiteliales); CanAg (tumores tales como carcinomas de colon y páncreas); mesotelina (muchos tumores incluyendo mesotelioma y adenocarcinoma de ovario y pancreático); P-cadherina (neoplasias malignas epiteliales, incluyendo adenocarcinoma de mama); miostatina (GDF8) (muchos tumores incluyendo sarcoma y adenocarcinoma de ovario y pancreático); Cripto (TDGF1) (neoplasias malignas epiteliales incluyendo cánceres de colon, mama, pulmón, ovario y pancreáticos); ACVRL 1/ALK1 (neoplasias malignas múltiples incluyendo leucemias y linfomas); MUC5AC (neoplasias malignas epiteliales, incluyendo adenocarcinoma de mama); CEACAM (neoplasias malignas epiteliales, incluyendo adenocarcinoma de mama); CD137 (linfocitos B o linfocitos T, autoinmunes, alérgicos o malignos); CXCR4 (linfocitos B o linfocitos T, autoinmunes, alérgicos o malignos); Neuropilina 1 (neoplasias malignas epiteliales, incluyendo cáncer de pulmón); Glipicanos (cánceres múltiples incluyendo cánceres de hígado, cerebro y mama); HER3/EGFR (neoplasias malignas epiteliales); PDGFRa (neoplasias malignas epiteliales); EphA2 (cánceres múltiples incluyendo neuroblastoma, melanoma, cáncer de mama, y carcinoma de pulmón microcítico); CD38 (mieloma); CD138 (mieloma); a4-integrina (AML, mieloma, CLL, y la mayoría de los linfomas).
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- La Tabla 2A proporciona ejemplos no limitantes de tipos de cáncer, posibles restos diana y proteasas que son expresadas por esos tipos de cáncer. Para preparar un sistema de dos componentes, el cáncer se puede identificar a partir de la columna 1, una o dos dianas elegidas para el resto de direccionamiento (si se desea) y también una o dos proteasas elegidas para el tipo de cáncer (si se desea). Otras secciones de la presente solicitud discuten cuándo usar uno frente a dos restos de direccionamiento y uno frente a dos sitios de escisión de proteasa.

Tabla 2A: Coordinación de tipo de cáncer, dianas para resto de direccionamiento, y proteasas que pueden escindir sitios de escisión

Cáncer	Dianas para resto de direccionamiento	Proteasas que pueden escindir sitios de escisión
Cáncer de próstata	ADAM17, CD59, EpCAM, HER2, Integrina αV, Integrina αVβ3, MCP-1, PCLA, PSCA, PSMA, RANKL, RG1, SLC44A4 STEAP-1, VEGF-C	KLK3 (PSA), KLK4, ADAM17, Catepsina B, uPA, uPAR, HPN, ST14, TMPRSS2
Cáncer de mama	CA125, CCN1, CD44, CD98, c-RET, DLL4, EpCAM, Episialina, GPNMB, HER2/neu, HER3, IGF-1R, Integrina α6β4, LFL2, LIV-1, Ly6E, MUC1, MUC18, NRP1, Fosfatidilserina, PRLR, TACSTD2, Tenascina C, TWEAKR, VANGL2, PD-L1, PD-L2	MMP2, MMP9, Catepsina L, Catepsina K, Catepsina B, MMP11, HPN, ST14, ADAM28
Mieloma	BCMA, IGF-1R, DKK-1, ICAM-1, CD138/Sindecano 1, CD38, GRP78, FGFR3, SLAMF6, CD48, TfR(CD71) APRIL, CD40, CD19, DR5, CXCR4	MMP2, MMP9, MMP1, MMP7, TMPRSS2, PRSS22, KLK11
Linfoma de linfocitos B	CD20, CD22, CD19, CD37, CD70, HLA-DR, CD70b	ADAM28, Catepsina B, MMP9

(continuación)

Tabla 2A: Coordinación de tipo de cáncer, dianas para resto de direccionamiento, y proteasas que pueden escindir sitios de escisión

Cáncer	Dianas para resto de direccionamiento	Proteasas que pueden escindir sitios de escisión
Cárcinoma de células renales	de HER2/neu, EGFR, ALK, EphA2, GD2, EGFRvIII, ALK	ST14, MMP9
Cáncer de pulmón	VEGFR-2, CLDN18, GCC, C242, HER2/neu, FGFR2, EpCAM, GPR49, HER3, IGFR	MMP2, MMP9, Catepsina B, uPA, uPAR
Glioblastoma	HER2/neu, EGFR, ALK, EphA2, GD2, EGFRvIII, ALK	MMP2, MMP9,
Linfoma de linfocitos T	CD2, CD4, CD5, CD71, CD30	Catepsina B, Catepsina D, MMP9
Linfoma de Hodgkin	CD30, CD40, IL-3Ra, CD30	Catepsina B
Cáncer de pulmón	EGFR, IGF-1R, HER3, Integrina α5β1, antígeno de Lewis y/b, EGFL7, TPBG, DKK-1, NaPi2b, fIt4, cMet, CD71	Catepsina B, MMP2, MMP9, ST14, ADAM17
Cáncer Pancreático	SLC44A4, uPAR, MUC1, MUCH16, TACSTD-2, CEA, EphhA4, mesotelina, EGFR, MUC13, MU5AC, AGF-1R, HER3, CD71	Catepsina B, ST14, ADAM28
Cáncer de cabeza y cuello	EGFR, EpCAM, HER2	Catepsina B, ST14, ADAM17
Leucemia mieloide aguda	CD33, CD133, CD123, CD45, CD98, c-Kit, Lewis Y, Siglec-15, FLT-3	ADAM17, Catepsina B, uPA, uPAR
Melanoma	MUC18, CD40, GD2, CEACAM1, Cadherina-19, GM3, Integrina α5β1, TYRP1, GD3, Integrina αV	Catepsina B, MMP9
Cáncer de ovario	HER2/neu, EpCAM, CA125, DLL4, Integrina αVβ3, MUC5A, NaPi2B, Mesotelina, CLDN6	Catepsina B, MMP2, MMP9
Cáncer de hígado	Glipican-3, FGFR4, ENPP3, PIVKA-II, PLVAP, cMet, EpCAM	Catepsina B, MMP9
Cáncer Colorrectal	EGFR, Lewis y/b, Progastrina, GPR49, CEA, CLDN1, A33, CK8, Integrina αV, EpCAM, DLL4, EGFL7, FAP,	Catepsina S, Catepsina L, Catepsina B, uPA, uPAR, MMP2, MMP9, ST14

Por ejemplo, cuando los restos de direccionamiento en el primer y el segundo componentes son diferentes, la Tabla 2B proporciona un listado no limitante de restos de direccionamiento potenciales para usar en combinación con tipos de cáncer en particular. En un sistema de dos componentes, un resto de direccionamiento podría estar presente para el primer componente y opcionalmente puede estar presente un segundo resto de direccionamiento para el segundo componente. Si solo el primer componente tiene un resto de direccionamiento o si el primer y el segundo componentes tienen el mismo resto de direccionamiento, cualquier resto de direccionamiento enumerado en la columna 1 o en la columna 2 de la tabla se puede usar cuando el tipo de cáncer está enumerado en la columna 3.

10

Tabla 2B: Restos de direccionamiento para uso en el sistema de dos componentes

Resto de direccionamiento para el primer componente	Resto de direccionamiento opcional para el segundo componente	Tipo de cáncer
Anticuerpo frente a CD20 (tal como Rituximab)	Anticuerpo frente a CD80	Linfoma
Anticuerpo frente a CD20 (tal como Rituximab)	Anticuerpo frente a CD22 (tal como Inotuzumab)	Linfoma
Anticuerpo frente a CD20 (tal como Rituximab)	Anticuerpo frente a CD70	Linfoma
Anticuerpo frente a HER2	Anticuerpo frente a EpCAM	Neoplasias malignas epiteliales
Anticuerpo frente a EGFR (tal como Cetuximab)	Anticuerpo frente a núcleo de proteína mucina	Cáncer de mama
Anticuerpo frente a EGFR (tal como Cetuximab)	Anticuerpo frente a HER2	Neoplasias malignas epiteliales
Anticuerpo frente a EGFR (tal como Cetuximab)	Receptor de anticuerpo frente a transferrina	Gliomas
Anticuerpo frente a gp95/gp97	Anticuerpo frente a p-glicoproteína	Melanomas resistentes a fármacos
Anticuerpo frente a TRAIL-R1	Anticuerpo frente a DR5	neoplasias malignas múltiples, incluyendo carcinoma de ovario y colorrectal
Anticuerpo frente a IL-4	Anticuerpo frente a IL-6	Linfomas y leucemia
Anticuerpo frente a CD19	Anticuerpo frente a CD22	Linfoma
Anticuerpo frente a PMSA	Anticuerpo frente a PSCA	Cáncer de próstata

(continuación)

Tabla 2B: Restos de direccionamiento para uso en el sistema de dos componentes

Resto de direcciónamiento para el primer componente	Resto de direcciónamiento opcional para el segundo componente	Tipo de cáncer
Anticuerpo frente a P-cadherina	Anticuerpo frente a Cripto (TDGF1)	Neoplasias malignas epiteliales
Anticuerpo frente a CD74	Anticuerpo frente a CD40	Linfomas
Anticuerpo frente a PD1L	Anticuerpo frente a IGF-1R	Adenocarcinoma epitelial
Anticuerpo frente a CD38	Anticuerpo frente a CD138	Mieloma
Anticuerpo frente a BCMA	Anticuerpo frente a CD138 o CD38	Mieloma
Anticuerpo frente a CD33	Anticuerpo frente a CD133	Neoplasias malignas mieloides, por ejemplo, AML
Anticuerpo frente a CD33	Anticuerpo frente a CD123	Neoplasias malignas mieloides tal como AML
Anticuerpo frente a CD49d	Anticuerpo frente a CD33	Neoplasias malignas mieloides
Anticuerpo frente a PSMA	Anticuerpo frente a PSCA	Cáncer de próstata
Anticuerpo frente a Glipicanos 3	Anticuerpo frente a cMet o EpCAM	Carcinoma hepatocelular
Anticuerpo frente a EpCAM	Anticuerpo frente a EGFR	Cáncer de pulmón
Anticuerpo frente a EpCAM	Anticuerpo frente a MUC1	Cáncer pancreático
Anticuerpo frente a EpcAM	Anticuerpo frente a EGFR	Carcinoma colorrectal
Anticuerpo frente a MUC1	Anticuerpo frente a EGFR	Carcinoma de ovario
Anticuerpo frente a GD2	Anticuerpo frente a HER2	Sarcoma
Anticuerpo frente a HER2	Anticuerpo frente a HER3	Cáncer de mama
Anticuerpo frente a IL-13R	Anticuerpo frente a EGFR	Cáncer cerebral

También se desvela en donde el resto de direcciónamiento no es un anticuerpo, pero es otro tipo de resto de direcciónamiento. Por ejemplo, un resto de direcciónamiento puede ser una pareja de unión para una proteína conocida por su expresión en la célula no deseada. Tales niveles de expresión pueden incluir sobreexpresión. Por ejemplo, las siguientes parejas de unión se pueden unir a las siguientes dianas en una célula no deseada:

Tabla 3: Parejas de unión que no son anticuerpos y dianas correspondientes

Pareja de unión	Diana en célula no deseada
IL-2	Receptor de IL-2
IL-4	Receptor de IL-4
IL-6	Receptor de IL-6
α-MSH	Receptor de MSH (receptor de hormona estimulante de melanocitos)
Transferrina	TR (receptor de transferrina)
Ácido fólico	FOLR (receptor 1 de folato) y/o FOLH1 (folato hidroxilasa)
EGF y/o TGFr	EGFR (receptor de EGF)
PD1	PD-L1 y/o PD-L2
IL13	IL-13R (Glioblastoma)
Factor de células madre	CXCR4
Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)	IGFR
CD40	CD40L

10 No es necesario que la pareja de unión comprenda la secuencia de longitud completa o de tipo silvestre para las parejas de unión que se enumeran en la Tabla 3. Todo lo que se requiere es que la pareja de unión se una a la diana en la célula no deseada y, por lo tanto, puede incluir formas truncadas, análogos, variantes, y derivados que se conocen bien en la técnica.

15 Además, la pareja de unión puede ser un aptámero que es capaz de unirse a una proteína conocida por qué se expresa en la célula no deseada. Los aptámeros que se unen a células no deseadas, tales como células cancerosas, se conocen bien y se conocen bien y se conocen métodos para diseñarlos.

20 Para seleccionar un panel de aptámeros específicos de células diana de una biblioteca de candidatos aleatorios se pueden usar sistemas SELEX basados en células. Un conjunto de ADNss se puede disolver en tampón de unión y se puede desnaturizarse y a continuación se puede incubar con células diana. Después del lavado, los ADN unidos se pueden eluir calentando y a continuación se pueden incubar con células negativas (si se desea), centrifugar y retirar el sobrenadante. El sobrenadante se puede amplificar mediante PCR con cebadores marcados con biotina. El ADNss de sentido (codificador) seleccionado se puede separar de la hebra biotinilada antisentido (no codificador) usando perlas revestidas con estreptavidina. Para aumentar la afinidad, se puede aumentar la fuerza del lavado aumentando

el tiempo de lavado, el volumen de tampón y el número de lavados. Después de las rondas de selección deseadas, el conjunto de ADNss seleccionado se puede amplificar por PCR y se puede clonar en *E. coli* y secuenciar. Véase Shangguan *et al.*, Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study, PNAS 103 (32):11838-11843 (2006); Lyu *et al.*, Generating Cell Targeting Aptamers for Nanotherapeutics Using Cell- SELEX,

- 5 Theranostics 6(9): 1440-1452 (2016); véase también Li *et al.*, Inhibition of Cell Proliferation by an Anti-EGFR Aptamer, PLoS One 6(6): e20229 (2011). Estas referencias describen enfoques específicos para diseñar aptámeros y aptámeros específicos que se unen a células cancerosas.

Por ejemplo, un aptámero puede comprender las SEQ ID NO: 94 a 164. En algunas realizaciones, un aptámero puede 10 comprender la SEQ ID NO: 95. Estos aptámeros están dirigidos a EGFR y se proporcionan solo como representativos de los aptámeros que se pueden unir a las dianas presentadas en células no deseadas. Otros aptámeros frente a otras dianas en células no deseadas se describen en Zhu *et al.*, Progress in Aptamer Mediated Drug Delivery Vehicles for Cancer Targeting, Theranostics 4(9): 931-944 (2014).

15 Los aptámeros para uso en el presente documento se pueden unir a la diana en la célula no deseada con una Kd en el intervalo nanomolar a picomolar (tal como de 1 picomolar a 500 nanomolar o de 1 picomolar a 100 nanomolar).

B. Dominio de acoplamiento de linfocitos T

20 El agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido comprende un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T que es incapaz de acoplarse a un linfocito T solo. En su lugar, el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es capaz de actividad cuando se une a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T, que no es parte del agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido. Por lo tanto, el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T 25 puede ser cualquiera de dos restos que no tengan actividad de acoplamiento de linfocitos T solos, pero que la tienen cuando se combinan entre sí. En otras palabras, el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T son mitades complementarias de una proteína activa funcional.

Cuando los dos dominios de acoplamiento de linfocitos T están asociados juntos en el sistema de dos componentes, se pueden unir al antígeno CD3 y/o al receptor de linfocitos T en la superficie del linfocito T, ya que estos activan los 30 linfocitos T. CD3 está presente en todos los linfocitos T y consta de subunidades denominadas y, 6, £, Z, y n. La cola citoplasmática de CD3 es suficiente para transducir las señales necesarias para la activación de los linfocitos T en ausencia de los otros componentes del complejo receptor de TCR. Normalmente, la activación de la citotoxicidad de los linfocitos T depende en primer lugar de la unión del TCR con una proteína del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que a su vez se une a un antígeno extraño, ubicado en una célula separada. En una 35 situación normal, solamente cuando se ha producido esta unión inicial de TCR-MHC, puede resultar la cascada significativa dependiente de CD3 responsable de la expansión clonal de los linfocitos T y, por último, de la citotoxicidad de los linfocitos T. Sin embargo, en algunos casos, cuando el sistema de dos componentes se une a CD3 y/o al TCR, la activación de los linfocitos T citotóxicos en ausencia de TCR-MHC independiente se puede producir en virtud de la reticulación de las moléculas de CD3 y/o TCR imitando una formación de sinapsis inmunitaria. Esto significa que los 40 linfocitos T se pueden activar por vía citotóxica de una manera clonalmente independiente, es decir, de una manera que es independiente del clon de TCR específico portado por el linfocito T. Esto permite la activación de todo el compartimento de los linfocitos T en lugar de solo los linfocitos T específicos de una determinada identidad clonal.

45 En una divulgación, el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH y el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL. En otra divulgación, el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL y el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH. En tales divulgaciones, cuando se emparejan juntos, el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T pueden comprender un scFv.

50 Si el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T son un par de dominios VH y VL, los dominios VH y VL pueden ser específicos para un antígeno expresado en la superficie de un linfocito T, tal como CD3 o TCR. Si el antígeno es CD3, un dominio de acoplamiento de linfocitos T potencial se puede obtener a partir de muromonab.

C. Pareja de unión inerte

55 El agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido también comprende al menos una pareja de unión inerte capaz de unirse al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y evitar que se una a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se produzcan ciertas condiciones. Cuando el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T está unido a la al menos una pareja de unión inerte, no tiene una actividad de acoplamiento de linfocitos T. En otras palabras, la al menos una pareja de unión inerte paraliza la función del primer dominio de acoplamiento de linfocitos T bloqueando la unión de su par complementario (el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T) y evitando que los dos dominios se unan juntos para tener una actividad de acoplamiento de linfocitos T. En otras palabras, la pareja de unión inerte se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T de modo que el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T no se una al segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la pareja de unión inerte. Al no unirse, la aplicación no excluye la unión inespecífica o bajos niveles de unión (por ejemplo, < 1 %, < 5 %, < 10 %).

La pareja de unión inerte se puede unir específicamente al dominio de acoplamiento de linfocitos T.

- 5 La al menos una pareja de unión inerte puede ser un dominio VH o VL. Cuando el dominio de acoplamiento de linfocitos T en el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido es un dominio VH, la pareja de unión inerte puede ser un dominio VL y cuando el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, la pareja de unión inerte puede ser un dominio VH.
- 10 Si un primer componente comprende un resto de direccionamiento y un dominio de acoplamiento de linfocitos T de VL y una pareja de unión inerte de VH, la pareja de unión inerte de VH puede tener una constante de disociación de equilibrio para unirse al dominio de acoplamiento de linfocitos T de VL, que es mayor que la constante de disociación de equilibrio del dominio de acoplamiento de linfocitos T de VL para su pareja de dominio de acoplamiento de linfocitos T de VH en el segundo componente. La frase anterior puede ser igualmente cierta cuando VH se cambia por VL y viceversa.
- 15 Basándose en la evidencia empírica de los ejemplos, se cree que el uso de la pareja de unión inerte como pareja de emparejamiento incorrecto con el dominio de acoplamiento de linfocitos T en el constructo da como resultado constructos que son más estables y más fáciles de fabricar.

20 D. Sitio de escisión

En el presente documento también se desvela únicamente como referencia que, el sitio de escisión se puede (i) escindir mediante una enzima expresada por las células no deseadas; (ii) escindir por medio de una reacción de escisión sensible al pH dentro de la célula no deseada; (iii) escindir mediante una reacción de escisión dependiente de complemento; o (iv) escindir mediante una proteasa que está colocalizada en la célula no deseada mediante un resto de direccionamiento que es igual o diferente al resto de direccionamiento en el agente. En el contexto de la invención, el sitio de escisión es un sitio de escisión de proteasa.

30 Los sitios de escisión funcionan para liberar la pareja de unión inerte del primer dominio de acoplamiento de linfocitos T. Los sitios de escisión pueden funcionar de diferentes maneras para liberar la pareja de unión inerte de los epítopos de linfocitos T del primer dominio de acoplamiento de linfocitos T en el microentorno de las células no deseadas. La escisión se puede producir dentro de la célula no deseada o fuera de la célula no deseada, dependiendo de la estrategia empleada. Si la escisión se produce fuera de la célula no deseada, el dominio de acoplamiento de linfocitos T se puede presentar sin internalizarse primero en una célula y acoplarse en las rutas clásicas de procesamiento de antígenos.

35 Al menos un sitio de escisión se puede escindir mediante una enzima expresada por las células no deseadas. Se sabe que las células cancerosas, por ejemplo, expresan ciertas enzimas, tales como proteasas, y estas se pueden emplear en esta estrategia para escindir el sitio de escisión del agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido. A modo de ejemplo no limitante, la catepsina B escinde FR, FK, VA y VR entre otros; la catepsina D escinde PRSFFRLGK (SEQ ID NO: 45), ADAM28 escinde KPAKFFRL (SEQ ID NO: 1), DPAKFFRL (SEQ ID NO: 2), KPMKFFRL (SEQ ID NO: 3) y LPAKFFRL (SEQ ID NO: 4); y MMP2 escinde AIPVSLR (SEQ ID NO: 46), SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO: 47), HPVGLLAR (SEQ ID NO: 48), GPLGVVRGK (SEQ ID NO: 49), y GPLGLWAQ (SEQ ID NO: 50), por ejemplo. También se pueden emplear otros sitios de escisión enumerados en las Tablas 1A o 2A. Los sitios de escisión de proteasa y las proteasas asociadas con el cáncer se conocen bien en la técnica. Oncomine (www.oncomine.org) es una base de datos de expresión génica del cáncer en línea, por lo que cuando el agente que se desvela en el presente documento es para tratar el cáncer, la persona con experiencia puede buscar en la base de datos Oncomine para identificar un sitio de escisión de proteasa en particular (o dos sitios de escisión de proteasa) que será apropiado para tratar un tipo de cáncer dado. Las bases de datos alternativas incluyen el European Bioinformatic Institute (www.ebi.ac.uk), en particular (www.ebi.ac.uk/gxa). Las bases de datos de proteasas incluyen PMAP (www.proteolysis.org), corte peptídico ExPASy (ca.expasy.org/tools/peptidecutter) y PMAP.Cut DB (cutdb.burnham.org).

40 En el presente documento también se desvela únicamente como referencia que, al menos un sitio de escisión se puede escindir por medio de una reacción de escisión sensible al pH dentro de la célula no deseada. Si el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido se internaliza en la célula, la reacción de escisión se puede producir dentro de la célula y se puede desencadenar por un cambio en el pH entre el microentorno fuera de la célula no deseada y el interior de la célula. Específicamente, se sabe que algunos tipos de cáncer tienen entornos ácidos en el interior de las células cancerosas. Este enfoque se puede emplear cuando el tipo de célula no deseada interior tiene un pH característicamente diferente del microentorno extracelular, tal como particularmente el glicocálix. Dado que la escisión por pH se puede producir en todas las células de las lisozimas, la selección de un agente de direccionamiento, cuando se usa un sitio de escisión sensible al pH, puede requerir, cuando se desee, más especificidad. Por ejemplo, cuando se usa un sitio de escisión sensible al pH, se puede desear un agente de direccionamiento que se une solo o muy preferentemente a las células cancerosas (tal como, por ejemplo, un anticuerpo que se une a la mesotelina para el tratamiento del cáncer de pulmón).

45 60 65 En el presente documento también se desvela únicamente como referencia que, al menos un sitio de escisión se

5 puede escindir mediante una reacción de escisión dependiente de complemento. Una vez que los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos se unen a la célula no deseada, se puede activar la cascada del complemento del paciente. En tal caso, la cascada del complemento también se puede usar para escindir la pareja de unión inerte del primer dominio de acoplamiento de linfocitos T mediante el uso de un sitio de escisión sensible a una proteasa del complemento. Por ejemplo, C1r y C1s y las convertasas C3 (C4B,2a y C3b,Bb) son serina proteasas. C3/C5 y C5
10 también son proteasas del complemento. También se pueden usar proteínas de unión asociadas a manosa (MASP), serina proteasas que también participan en la cascada del complemento y son responsables de la escisión de C4 y C2 en C4b2b (una convertasa C3). Por ejemplo, y sin limitación, C1s escinde YIGrSYKV y MQLGRX. Se cree que MASP2 escinde SLGRKIQI. Se cree que el componente del complemento C2a y el factor del complemento Bb escinden GLARSNLDE.

15 En el presente documento también se desvela únicamente como referencia que, al menos un sitio de escisión se puede escindir mediante una proteasa que está colocalizada en la célula no deseada mediante un resto de direccionamiento que es igual o diferente al resto de direccionamiento en el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido. Por ejemplo, cualquier proteasa se puede dirigir simultáneamente al microentorno de las células no deseadas conjugando la proteasa con un agente de direccionamiento que suministra la proteasa a esa ubicación. El agente de
20 direccionamiento puede ser cualquier agente de direccionamiento que se describe en el presente documento. La proteasa se puede fijar al agente de direccionamiento mediante un péptido o conector químico y puede mantener suficiente actividad enzimática cuando se une al agente de direccionamiento.

25 Tanto el primer componente como el segundo componente pueden presentar emparejamiento incorrecto con una pareja de unión inerte. En una divulgación, el sitio de escisión de proteasa en el primer componente y en el segundo componente es el mismo iguales. En otra divulgación, los sitios de escisión de proteasa en el primer componente y en el segundo componente son diferentes sitios de escisión para la misma proteasa. En otra divulgación, los sitios de escisión de proteasa en el primer componente y en el segundo componente son sitios de escisión para diferentes proteasas. En algunas divulgaciones que emplean dos proteasas diferentes, la célula no deseada expresa ambas proteasas.

30 En una divulgación, en un primer componente, la pareja de unión inerte en un estado no escindido interfiere con la unión específica de un dominio de acoplamiento de linfocitos T, VL o VH, a su pareja de dominio de acoplamiento de linfocitos T, VH o VL, respectivamente, en un segundo componente. En una divulgación, la pareja de unión inerte en un estado no escindido inhibe la unión del dominio de acoplamiento de linfocitos T, VL o VH, a su pareja de dominio de acoplamiento de linfocitos T, VH o VL, respectivamente, en un segundo componente de modo que la constante de
35 disociación (Kd) del dominio de acoplamiento de linfocitos T, VL o VH, para su pareja de dominio de acoplamiento de linfocitos T, VH o VL, respectivamente, en un segundo componente en un estado no escindido sea al menos 100 veces mayor que la Kd del dominio de acoplamiento de linfocitos T, VL o VH, para su pareja de dominio de acoplamiento de linfocitos T, VH o VL, respectivamente, en un segundo componente en estado escindido.

E. Conectores

40 Además del sitio de escisión, opcionalmente se pueden usar conectores para unir las partes separadas de los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos juntas. Por conector, los investigadores incluyen cualquier resto químico que une estas partes. En algunas realizaciones, los conectores pueden ser conectores flexibles. Los conectores incluyen péptidos, polímeros, nucleótidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y especies orgánicas lipídicas (tal como polietilenglicol). En algunas realizaciones, el conector es un conector peptídico. Los conectores peptídicos pueden tener una longitud de aproximadamente 2-100, 10-50 o 15-30 aminoácidos. En algunas realizaciones, los conectores peptídicos pueden tener al menos 10, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos de longitud y no más de 80, no más de 90 o no más de 100 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector es un conector peptídico que tiene una secuencia o secuencias GGGGS (SEQ ID NO: 85), GGGS (SEQ ID NO: 86), GS (SEQ ID NO: 87), GSGGS (SEQ ID NO: 88), GGSG (SEQ ID NO: 89), GGSGG (SEQ ID NO: 90), GSGSG (SEQ ID NO: 91), GS GGGG (SEQ ID NO: 92), GGGSG (SEQ ID NO: 93), y/o GSSSG (SEQ ID NO: 94) únicas o de repetición.

En algunas realizaciones, el conector es un conector de maleimida (MPA) o SMCC.

F. Métodos de fabricación

60 Los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos, como se describe en el presente documento, se pueden fabricar usando técnicas de ingeniería genética. Específicamente, un ácido nucleico se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido. Por ejemplo, se puede preparar un vector que comprenda una secuencia de ácidos nucleicos que codifique el agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido incluyendo todas sus partes componentes y conectores y ese vector se puede usar para transformarse en una célula hospedadora apropiada.

65 En el vector también se pueden usar diversos elementos reguladores, dependiendo de la naturaleza del hospedador y la forma de introducción del ácido nucleico en el hospedador, y, si se desea, el mantenimiento o la integración episómica.

También se pueden emplear técnicas de enlace químico, tales como el uso de conectores de maleimida o SMCC.

5 En los casos en los que la pareja de unión es un aptámero, una persona con experiencia habitual en la materia podría comprender cómo conjugar un aptámero con una proteína, es decir, el dominio de acoplamiento de linfocitos T. Los aptámeros se pueden conjugar usando un enlace tiol u otras químicas de conjugación estándar. Un grupo maleimido, succinimido o SH se puede añadir al aptámero para unirlo al dominio de acoplamiento de linfocitos T.

II. Composiciones farmacéuticas

10 Los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos se pueden emplear como composiciones farmacéuticas. Como tales, se pueden preparar junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Si se desea la administración

15 parenteral, por ejemplo, los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos se pueden proporcionar en agua para inyección estéril, sin pirógenos o solución salina estéril, sin pirógenos. Alternativamente, los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos se pueden proporcionar en forma liofilizada para resuspensión con la adición de un vehículo líquido estéril.

III. Métodos de tratamiento

A. Reducción de células no deseadas, direccionamiento de la respuesta inmunitaria y tratamiento del cáncer

20 Los agentes de acoplamiento de linfocitos T dirigidos que se describe en el presente documento se pueden usar en un método de tratamiento de una enfermedad en un paciente caracterizada por la presencia de células no deseadas que comprende administrar un sistema de dos componentes que comprende al menos un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido y un segundo componente al paciente, ya que cada uno de los componentes se ha descrito en detalle de varias formas anteriormente. Además, los agentes que se describen en el presente documento también se pueden usar en un método para dirigir la propia respuesta inmunitaria del paciente a células no deseadas que comprende administrar un sistema de dos componentes al paciente.

25 La cantidad de agente administrado al paciente la puede elegir el médico del paciente para proporcionar una cantidad eficaz para tratar la afección en cuestión. El primer componente y el segundo componente del sistema de dos componentes se pueden administrar en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes dentro de un periodo de tiempo suficientemente cercano para que sean activos en el paciente.

30 35 El paciente que recibe el tratamiento puede ser un ser humano. El paciente puede ser un primate o cualquier mamífero. Alternativamente, el paciente puede ser un animal, tal como un animal domesticado (por ejemplo, un perro o un gato), un animal de laboratorio (por ejemplo, un roedor de laboratorio, tal como un ratón, rata o conejo) o un animal importante en agricultura (tal como caballos, bovinos, ovinos o caprinos).

40 45 50 La afección caracterizada por células no deseadas puede incluir cáncer. El cáncer puede ser una neoplasia maligna sólida o no sólida. El cáncer puede ser un tumor sólido en donde el tumor sólido no es un Linfoma. El cáncer puede ser cualquier cáncer tal como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer renal, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, leucemia, mieloma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, trastorno linfoproliferativo, trastorno mielodisplásico, enfermedad mieloproliferativa y enfermedad premaligna.

55 El sistema de dos componentes se puede administrar solo o en conjunto con otras formas de terapia, incluyendo cirugía, radiación o quimioterapia tradicional.

Ejemplos

55 Ejemplo 1. Preparación de constructos

En los ejemplos se prepararon y usaron diversos constructos, tanto de control como experimentales.

A. Constructos biespecíficos de scFv de cadena única

60 En la presente solicitud se usó un constructo de scFv de cadena única para que sirviera como control positivo. El constructo 6245 (SEQ ID NO: 165) se preparó como un anticuerpo biespecífico que comprende un scFv anti-EPCAM y un scFv anti-CD3E. Este constructo no comprende ningún emparejamiento incorrecto con una pareja de unión inerte y tiene restos tanto de direccionamiento activo como de acoplamiento de linfocitos T.

65 B. Constructos de sistemas de dos componentes escindidos previamente que usan un scFv de

direccionamiento

Los constructos 6246 (SEQ ID NO: 166) y 6247 (SEQ ID NO: 167) son constructos escindidos previamente complementarios en un sistema de dos componentes. Por escindido previamente, la descripción se refiere a un constructo con un resto de direccionamiento funcional y un resto de acoplamiento de linfocitos T no emparejado (es decir, uno que no tiene un emparejamiento incorrecto con una pareja de unión inerte y uno que tampoco está emparejado todavía con su pareja correcta para formar un complejo de acoplamiento de linfocitos T funcional). Ambos constructos comprenden un scFv anti-EPCAM. El constructo 6246 comprende un dominio VH anti-CD3E, mientras que el constructo 6247 comprende un dominio VL anti-CD3E. Ninguna construcción contiene una pareja de unión inerte como pareja de emparejamiento incorrecto.

C. Constructos de sistema de dos componentes que usan un scFv de direccionamiento y un dominio de acoplamiento de linfocitos T emparejado incorrectamente con una pareja de unión inerte, así como un sitio de escisión de proteasa para liberar la pareja de unión inerte

Los constructos 6248 (SEQ ID NO: 168) y 6249 (SEQ ID NO: 169) son constructos complementarios en un sistema de dos componentes. Ambos constructos comprenden un scFv anti-EPCAM. El constructo 6248 comprende un dominio VH anti-CD3E unido mediante un conector de 25-meros que tiene un sitio de escisión de MMP2 (AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) a un dominio VL de pareja de unión inerte de gantenerumab. El constructo 6249 comprende un dominio VL anti-CD3E unido mediante un conector de 25-meros que tiene un sitio de escisión de MMP2 (AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) a un dominio VH de pareja de unión inerte del anticuerpo alfa-MUC1-1 de clon.

D. Constructos de sistema de dos componentes con un resto de direccionamiento, y un dominio de acoplamiento de linfocitos T emparejado incorrectamente con una pareja de unión inerte sin un sitio de escisión de proteasa para liberar la pareja de unión inerte

Los constructos 9327 (SEQ ID NO: 170) y 9328 (SEQ ID NO: 171) son constructos de sistema de los componentes que usan un dominio de direccionamiento de scFv; sin embargo, no tienen un sitio de escisión de proteasa para liberar la pareja de unión inerte que sirva como resto de emparejamiento incorrecto. Ambos constructos comprenden un scFv anti-EpCAM para dirigir los constructos a las células no deseadas que expresan EpCAM. El constructo 9327 comprende un dominio VH anti-CD3E unido por un conector de 25-meros que no tiene un sitio de escisión de proteasa correspondiente a una proteasa usada en los ejemplos a un dominio VL de pareja de unión inerte de gantenerumab. El constructo 9328 comprende un dominio VI anti-CD3E unido por un conector de 25-meros que no tiene un sitio de escisión de proteasa correspondiente a una proteasa usada en los ejemplos a un dominio Vh de pareja de unión inerte del anticuerpo alfa-MUC1-1 clon.

Dado que estos constructos no tienen un sitio de escisión de proteasa correspondiente a una proteasa usada en los ejemplos, la pareja de unión inerte permanecerá unida al constructo, evitando que los dos posibles componentes complementarios del sistema de dos componentes se unan para crear un scFv anti-CD3E activo.

E. Constructos que proporcionan diferentes restos de direccionamiento

Los constructos 9329 (SEQ ID NO: 172) y 9330 (SEQ ID NO: 173) proporcionan diferentes restos de direccionamiento. Se pretendía usar estos constructos en sistemas de dos componentes donde un constructo se dirige a un primer antígeno en una célula cancerosa y el segundo constructo se dirige a un segundo antígeno en la misma célula cancerosa. Dado que el tamaño relativo de los restos de direccionamiento de scFv y VHH son similares, se pretendía que estos constructos se "mezclaran y emparejaran" con los constructos emparejables que tienen un dominio VL anti-CD3E.

El constructo 9329 comprende una secuencia de VHH anti-glipicano-3. También comprende un dominio VH anti-CD3E unido por un conector de 25-meros que comprende un sitio de escisión de MMP2 (AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) a un dominio VL de pareja de unión inerte de gantenerumab.

El constructo 9330 comprende un scFv anti-SDC1 de indatuximab como resto de direccionamiento. También comprende un dominio VH anti-CD3E unido por un conector de 25-meros que comprende un sitio de escisión de MMP2 (AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) a un dominio VL de pareja de unión inerte de gantenerumab.

F. Constructos biespecíficos de VHH/scFv

Los constructos 9332 (SEQ ID NO: 174) y 9333 (SEQ ID NO: 175) son constructos biespecíficos de VHH/scFv que comprenden una porción de VHH anti-EGFR y una porción de scFv anti-CD3E. Estos dos constructos no comprenden un dominio de unión de inserto.

G. Constructos de sistema de dos componentes que usan un dominio VHH de direccionamiento, un dominio de acoplamiento de linfocitos T emparejado incorrectamente con una pareja de unión inerte y que comprende

un sitio de escisión de proteasa para liberar la pareja de unión inerte

Los constructos 9334 (SEQ ID NO: 176) y 9335 (SEQ ID NO: 177) son constructos de sistemas de dos componentes complementarios que usan un dominio VHH de direccionamiento. Ambos constructos comprenden un dominio VHH anti-EGFR para dirigirse a las células no deseadas que expresan EGFR. El constructo 9334 comprende un dominio

5 VH anti-CD3E unido por un conector de 25 meros que tiene un sitio de escisión de MMP2 (AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) a un dominio VL de pareja de unión inerte de gantenerumab. El constructo 9335 se preparó comprendiendo un dominio VH anti-CD3E unido por un conector de 25-meros que tiene un sitio de escisión de MMP2 (AIPVSLR (SEQ ID NO: 46)) a un dominio VH de pareja de unión inerte del anticuerpo alfa-MUC1-1 de clon.

10 Por lo tanto, como resumen, los constructos son los que se proporcionan en la Tabla 4, con más detalles y secuencias proporcionadas anteriormente en la Tabla 1B, con IBD representando la pareja de unión inerte.

Tabla 4: Sumario de constructos

N.º	Resto de direcciónamiento	Resto de acoplamiento de linfocitos T?	¿IBD? ¿Escisión?	¿Con qué se empareja?
6245	scFv anti-EpCAM	scFv anti-CD3E	sin IBD, sin escisión	No es necesario emparejamiento para la actividad de TCE (control positivo)
6246	scFv anti-EPCAM	VH anti-CD3E	sin IBD, sin escisión	se empareja con al menos 6247
6247	scFv anti-EPCAM	VL anti-CD3E	sin IBD, sin escisión	se empareja con al menos 6246
6248	scFv anti-EPCAM	VH anti-CD3E	sitio de escisión deseado	se empareja con al menos 6249 MMP2 y VL inerte
6249	scFv anti-EPCAM	VL anti-CD3E	sitio de escisión deseado	se empareja con al menos 6248 MMP2 y VH inerte
9327	scFv anti-EpCAM	VH anti-CD3E	sin sitio de escisión y no se puede emparejar fácilmente con VL inerte	9328 porque no tiene sitio de escisión (control negativo)
9328	scFv anti-EpCAM	VL anti-CD3E	sin sitio de escisión y no se puede emparejar fácilmente con VH inerte	9327 porque no tiene sitio de escisión (control negativo)
9329	VHH anti-Glipicano 3	VH anti-CD3E	sitio de escisión deseado	"mezclar y emparejar" con constructos emparejables que tienen un dominio VL anti-CD3E
9330	scFv anti-SDC1 de indatuximab	VH anti-CD3E	sitio de escisión deseado	"mezclar y emparejar" con constructos emparejables que tienen un dominio VL anti-CD3E
9332	VHH anti-EGFR (7D12)	scFv anti-CD3E	sin IBD, sin escisión	no es necesario emparejamiento para la actividad de TCE (control positivo)
9333	VHH anti-EGFR (9D8)	scFv anti-CD3E	sin IBD, sin escisión	no es necesario emparejamiento para la actividad de TCE (control positivo)
9334	VHH anti-EGFR	VH anti-CD3E	sitio de escisión deseado	se empareja con al menos 9335 MMP2 y VL inerte
9335	VHH anti-EGFR	VL anti-CD3E	sitio de escisión deseado	se empareja con al menos 9334 MMP2 y VH inerte

H. Preparación y almacenamiento de todos los constructos

Los constructos se generaron mediante DNA2.0 (Newark, California) y se expresaron en células HEK293T. Se diseñaron oligonucleótidos monocatenarios para cubrir una secuencia específica con una etiqueta de hexahistidina C-terminal para ayudar con la purificación en dirección descendente. Los oligonucleótidos se sintetizaron por vía química

20 y a continuación se ensamblaron usando una variedad de protocolos patentados dependiendo de las características de la secuencia. En algunos casos, se usó PCR independiente del molde. En algunos casos, se ensamblaron secuencias más pequeñas para crear secuencias más grandes mediante el uso de digestión con enzimas de restricción estándar y ensamblaje mediado por ligasa. A continuación, los oligonucleótidos ensamblados se clonaron en plásmidos de *E. coli* estándar y la secuencia bicatenaria completa se verificó mediante secuenciación automática de Sanger en el hardware ABI. Los constructos se expresaron mediante transfección transitoria en células HEK293T a una escala de 150 ml y los fragmentos de anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad.

25 Antes de que comenzaran los experimentos, los constructos se descongelaron en hielo y se dividieron en alícuotas en condiciones estériles en tubos de baja unión a proteínas. Las alícuotas se almacenaron a - 80 °C hasta que se requirieron. Las alícuotas se descongelaron en hielo inmediatamente antes de su uso. Se usaron alícuotas durante un máximo de cinco ciclos de congelación-descongelación.

Ejemplo 2. Fabricación de constructo de evaluación

A. Figura 5A: Evaluación de constructos mediante SDS PAGE y tinción con azul de Coomassie

Las alícuotas de anticuerpo descongelaron en hielo, y se diluyeron en Tris 25 mM a pH 7,4 hasta una concentración final de 2,0 mg/ml. Si los constructos tuvieran una dilución mayor que la mencionada, se podría omitir la etapa de dilución. A cada muestra se añadió un volumen apropiado de 6X tampón de muestra en gel (Tris 0,5 M a pH 6,8, SDS al 12 % (p/v), glicerol al 25 % (v/v), EDTA 5 mM, N-etilmaleimida 200 mM), que a continuación se calentó a 90 °C durante 10 minutos.

Se desarrollaron 10 pg de cada constructo en un gel de gradiente al 4-20 % fabricado previamente. Una vez desarrollados, los geles se fijaron durante 30 minutos en tampón de tinción (ácido acético al 10 %, metanol al 50 % (v/v) y dH₂O al 40 % (v/v)) y a continuación se hizo tinción durante 2 horas con azul de Coomassie R-250 (0,25 % en tampón de tinción), seguido de destecho de 2 a 3 horas en tampón de tinción con varios cambios de tampón si fuera necesario. Los geles se almacenaron en ácido acético al 7 % (v/v) antes de la documentación.

Los resultados se muestran en la Figura 5A. Esto muestra que las proteínas se han preparado y tienen una pureza muy alta, junto con la masa molecular correcta predicha por su secuencia.

B. Figura 5B

En la Figura 5B se evaluaron constructos adicionales. El método usado para la Figura 5A se usó para 5B.

Los constructos 6245 (el constructo biespecífico que no requiere emparejamiento), 6248 y 6248 (constructos emparejables con una pareja de unión inerte y un sitio de escisión de MMP2) se produjeron de forma adecuada. Los constructos 6246 y 6247 (que no contienen una pareja de unión inerte) se produjeron con rendimientos bajos y se cree que son inestables. Es probable que el emparejamiento de VH/VL sea importante para la estabilidad del fragmento.

Por lo tanto, los investigadores creen que los constructos con emparejamientos incorrectos con una pareja de unión inerte son más estables y más fáciles de fabricar.

C. Rendimiento

El rendimiento de los constructos evaluados en la Figura 5B fue el que sigue a continuación:

Tabla 5: Rendimientos	
Constructo	Rendimiento (mg)
6245	13,29
6246	0,57
6247	3,24
6248	17,54
6249	43,52

Ejemplo 3. Evaluación de la expresión de FN γ en linfocitos T mezclados con líneas de células tumorales y tratados con diversos constructos

Las preparaciones de constructos individuales y constructos mixtos se sometieron a ensayo para determinar su expresión de FN γ para probar la capacidad de los constructos complementarios en un sistema de dos componentes para provocar una respuesta de linfocitos T.

Antecedentes de los ensayos de FN γ en general: Se sabe que la expresión de marcadores de citoquinas *in vitro*, tal como la expresión de FN γ , tiene un valor predictivo para las respuestas de los linfocitos T y, por lo tanto, predice resultados *in vivo*. Como se describe en Ghanekar *et al.*, Clin Diag Lab Immunol j8(3): 628-31 (2001), la expresión de FN γ en linfocitos T CD8+ medida por citometría de flujo de citoquinas (CFC) es un marcador sustituto para la respuesta de linfocitos T citotóxicos. Ghanekar en 628. Algunos trabajos anteriores demostraron que existe una fuerte correlación entre la expresión de FN γ por los linfocitos T CD8+ y la actividad de las células efectoras CTL. Ghanekar en 630. Algunos trabajos anteriores muestran que el uso de datos sobre la expresión de FN γ permite una mayor precisión en la evaluación de las respuestas de los linfocitos T CD8+ en un entorno clínico. *Id.* en 631. Esto demuestra que se sabía que los ensayos de expresión de citoquinas en el presente documento tenían un valor predictivo para las respuestas *in vivo* y clínicas. Aunque los métodos del presente documento no siguen las etapas

exactas del método de Ghanekar porque hay múltiples formas de evaluar la expresión de FN γ , Ghanekar demuestra que la expresión de FN γ es una aproximación para la actividad de los linfocitos T.

Cultivo de líneas de linfocitos T: En los ensayos de FNy se usaron linfocitos T citotóxicos y se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía L-glutamina 4,0 mM, penicilina y estreptomicina al 1 %, FBS inactivado por calor al 10 %, suero humano inactivado por calor al 1 % (suero AB combinado, TCS Bioscience) y 1.000 U/ml de IL-2. Las células 5 se mantuvieron a una densidad de $1\text{-}2 \times 10^6$ células/ml y se alimentaron reemplazando tres cuartos del medio cada 48 horas. Se generaron originalmente mediante la adición de 10 ug de péptido NLVPMVATV viral restringido por HLA-A*0201 a 10 millones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante + para HLA-A * 0201. Las células 10 se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía L-glutamina 4,0 mM, penicilina y estreptomicina al 1 %, FBS inactivado por calor al 10 % y suero humano inactivado por calor al 1 % (suero AB combinado, TCS Bioscience) durante cuatro días antes de cambiar el medio para que incluyera 1000 U/ml de IL-2. Los linfocitos T eran predominantemente linfocitos T CD8+ con una pequeña cantidad de linfocitos T CD4+ también.

Cultivo de líneas celulares tumorales: Se usaron las siguientes líneas celulares: SW620, MCF-7, SNU398 y U266. Las células 15 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 % excepto las células SNU398 y U266 que se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía FBS inactivado por calor al 10 %, glutamina 2 mM y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células SW620 se obtienen a partir de una metástasis de cáncer de colon humano. Las células MCF-7 se obtienen a partir de un sitio metastásico de cáncer de mama humano (derrame pleural). Las células SNU398 se obtienen a partir de un paciente con carcinoma hepatocelular anaplásico humano en 1990. Las células U266 se obtienen a partir de un paciente con mieloma múltiple masculino 20 que secreta IgE.

Impacto de los constructos en la producción de FNy: Las líneas de células adherentes se sembraron en placas de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) durante al menos 16 horas. Las células no adherentes (100.000 células por pocillo) se sembraron en placas el día del experimento centrifugando el cultivo a 400 x g durante 5 minutos y resuspendiendo las células en medio de linfocitos T. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los 25 constructos se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron a los cultivos. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO2 al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. Los cultivos se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en 30 una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy.

ELISA de FNy: Los niveles de FNy en sobrenadantes de cultivo tisular se sometieron a ensayo usando un kit de ELISA Ready-Set-Go de eBioscience (n.º de cat. 88-7316-88) o un kit ELISA Max de FNy humano de BioLegend (n.º de cat. 430106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35

A. Figura 6

El FNy se evaluó para diversos constructos individuales y constructos mixtos. La producción de FNy y los protocolos 40 de ensayo de ELISA proporcionados anteriormente se usaron, excepto en los casos indicados. Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final de 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Los controles fueron PHA-M (concentración final de 10 µg/ml), células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células 45 SW620 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO2 al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy.

50 El FNy se evaluó para diversos constructos individuales y constructos mixtos. Los constructos individuales se evaluaron, con el constructo 6425 (un scFv biespecífico para EpCAM y CD3E) sirviendo como control positivo. El valor inicial de FNy se evaluó en linfocitos T con células cancerosas SW620, células cancerosas SW620 solas, y linfocitos T estimulados de forma no específica con fitohemaglutinina (PHA) para mostrar la capacidad de los linfocitos T para expresión de FNy.

55

En las células tumorales SW620, los constructos se usaron a una concentración final de 1 µg/ml. Los cultivos se incubaron durante 4 horas y los sobrenadantes se sometieron ensayo para FNy. Se proporciona la media ± desviación estándar de triplicados. Se evaluó para diversos constructos individuales y constructos mixtos. Los cultivos se incubaron durante 4 horas y los sobrenadantes se sometieron ensayo para FNy. Se proporciona la media ± desviación 60 estándar de triplicados. Los constructos se usaron a una concentración final de 1 µg/ml. Los cultivos se incubaron durante 24 horas y los sobrenadantes se sometieron ensayo para FNy. Se proporciona la media ± desviación estándar de triplicados.

65 El constructo 6245 sirve como control positivo porque este constructo tiene un direccionamiento tanto de scFv anti-EpCAM como de scFv anti-CD3E; por lo tanto, es un constructo biespecífico que no requiere emparejamiento para actividad de acoplamiento de linfocitos T (TCE).

Los constructos 6248 y 6249 (pares de un sistema de dos componentes que tiene cada uno una pareja de unión inerte separada del VL o VH de acoplamiento de linfocitos T anti-CD3E, respectivamente, mediante un conector con un sitio de escisión de MMP2) mostraron más expresión de FNy cuando se emparejaron juntos que cuando se administraron solos. La combinación de 6246 y 6247 (pares de un sistema de dos componentes sin ningún emparejamiento incorrecto con una pareja de unión inerte o sitio de escisión de proteasa requerido para que se asocien) proporciona una respuesta mucho menor que la combinación de 6248 y 6249 probablemente debido a que 6246 y 6247 no están protegidos durante la fabricación mediante la pareja de unión inerte, que se cree que estabiliza los dominios VH y VL anti-CD3E sin emparejar en cada constructo, respectivamente. Por lo tanto, los investigadores creen que los constructos con emparejamientos incorrectos que tienen una pareja de unión inerte son más estables y más fáciles de fabricar que los constructos escindidos previamente que tienen un dominio VH o VL anti-CD3E sin emparejar.

B. Figura 7

El FNy se evaluó para diversos constructos individuales y constructos mixtos. Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final de 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos (la concentración final de los constructos fue de 1 µg/ml por constructo). Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células SW620 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO2 al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy. Se proporciona la media ± desviación estándar de triplicados.

El constructo 6245 sirve como control positivo porque este constructo tiene un direccionamiento tanto de scFv anti-EpCAM como de scFv anti-CD3E; por lo tanto, es un constructo biespecífico que no requiere emparejamiento para actividad de acoplamiento de linfocitos T (TCE).

Los constructos 6248 y 6249 (pares de un sistema de dos componentes que tiene cada uno una pareja de unión inerte separada del VL o VH de acoplamiento de linfocitos T anti-CD3E, respectivamente, mediante un conector con un sitio de escisión de MMP2) mostraron más expresión de FNy cuando se emparejaron juntos que cuando se administraron solos. La combinación de 6246 y 6247 (pares de un sistema de dos componentes sin ningún dominio de unión o sitio de escisión de proteasa requerido para que se asocien) proporciona una respuesta mucho menor que la combinación de 6248 y 6249 probablemente debido a que 6246 y 6247 no están protegidos durante la fabricación mediante la pareja de unión inerte, que se cree que estabiliza los dominios VH y VL anti-CD3E sin emparejar en cada constructo, respectivamente. Por lo tanto, los investigadores creen que los constructos con emparejamientos incorrectos que tienen una pareja de unión inerte son más estables y más fáciles de fabricar que los constructos con un dominio VH o VL anti-CD3E sin emparejar.

C. Figura 8

Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final que varía de 1 ng/ml a 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos (la concentración final de los constructos varió de 1 ng/ml a 1 µg/ml por constructo). Los controles fueron células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células SW620 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO2 al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy. En la Figura 8 se muestra la media ± desviación estándar de triplicados.

Los constructos 6245 sirvieron como control positivo y se evaluaron los constructos emparejados 6248 y 6249. Tanto el constructo de control como el sistema de dos componentes emparejados mostraron expresión de FNy. Esto demuestra que los dominios inertes VL y VH se están escindiendo a partir de los constructos 6248 y 6249, respectivamente, y que estos dos constructos se están emparejando para crear un scFv anti-CD3E completo, que es capaz de acoplarse a linfocitos T.

El sistema de dos componentes (6248 y 6249) tiene una potencia menor que el constructo 6245 biespecífico, aunque todavía está en un intervalo aceptable y realmente puede ofrecer ventajas de dosificación al evitar efectos secundarios.

65

D. Figuras 9A-B

- Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final que varía de 1 ng/ml a 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos (la concentración final de los constructos varió de 10 ng/ml a 10 µg/ml por constructo). Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células SW620 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy. En las Figuras 9A-B se muestra la media ± desviación estándar de triplicados.
- Tanto el constructo de control como el sistema de dos componentes emparejados mostraron expresión de FNy. Esto demuestra que los dominios inertes VL y VH se están escindiendo a partir de los constructos 6248 y 6249, respectivamente, y que estos dos constructos se están emparejando para crear un scFv anti-CD3E completo, que es capaz de acoplarse a linfocitos T.
- El sistema de dos componentes (6248 y 6249) tiene una potencia menor que el constructo 6245 biespecífico, aunque todavía está en un intervalo aceptable y realmente puede ofrecer ventajas de dosificación al evitar efectos secundarios.

E. Figura 10

- Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final de 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos (la concentración final de los constructos fue de 1 µg/ml por constructo). Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células SW620 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy. La Figura 10 proporciona la media ± desviación estándar de triplicados.

La Figura 10 muestra un nivel muy bajo de expresión de FNy para los constructos que tienen solo un VH o VL para el scFv anti-CD3E; sin embargo, los constructos biespecíficos positivos con un scFv completo (9332 y 9333) mostraron niveles de expresión de FNy más altos.

F. Evaluación estequiometría de constructos complementarios de un sistema de dos componentes (Figura 11)

- Los constructos complementarios de un sistema de dos componentes (6248 y 6249) se añadieron juntos en relaciones variables, como se muestra en la Figura 11.

Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos se mezclaron previamente en las relaciones especificadas en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo (la concentración final de los constructos fue de 1 µg/ml en total). Los dos componentes, 6248 y 6249, uno contenido el dominio VH del resto de activación de CD3 (6249) y el otro contenido el dominio VL del resto de activación de CD3 (6248), se mezclaron previamente en las relaciones 100:0, 90:10, 75:25, 50:50, 25:75, 10:90 y 0:100. Las mezclas de los dos componentes se añadieron a 100.000 células tumorales no deseadas y 20.000 linfocitos T. Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células SW620 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy.

Los resultados de la Figura 11 demuestran una activación creciente de los linfocitos T a medida que la proporción de los dos componentes alcanza el equilibrio. Cuando hay un exceso del componente que contiene el dominio VH del resto de activación de CD3 (6249) o del otro componente que contiene el dominio VL del resto de activación de CD3 (6248), la activación de los linfocitos T disminuye ya que la activación es dependiente tanto en el VH como en el VL del resto de activación de CD3 que se unen. Por lo tanto, los niveles de expresión de FNy eran mucho más bajos

cuando todos o casi todos los constructos proporcionados eran de un tipo u otro. El nivel de expresión de FNy más alto corresponde al escenario en donde se proporcionó una cantidad igual de cada uno de los dos constructos complementarios. Esto proporciona evidencia adicional que demuestra que la expresión de FNy está causada por las dos mitades del scFv anti-CD3E que se unen a partir de los dos constructos en el sistema de dos componentes.

5

G. Uso de células MCF-7 (Figura 12)

La Figura 12 muestra experimentos realizados en la línea de células tumorales MCF-7. Se cultivaron células MCF-7 en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final de 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células MCF-7 más linfocitos T sin adiciones, y células MCF-7 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy.

Se obtuvieron resultados similares a los de las otras líneas celulares usadas. En la Figura 12, los constructos 6245, 20 9332 y 9333 de control positivo (cada uno con un scFv anti-CD3E completo) mostraron niveles de expresión de FNy mucho más altos que cualquiera de los componentes individuales que comprenden solo un dominio VH o VL del anticuerpo anti-CD3E. La Figura 12 también proporciona niveles de expresión de FNy basales para células MCF-7 solas o linfocitos T estimulados de forma inespecífica con PHA.

H. Figuras 13-14

Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final de 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos (la concentración final de los constructos fue de 1 µg/ml por constructo). Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células SW620 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy.

En la Figura 13, los datos muestran que el sistema de dos componentes de 6248 y 6249 funciona como se esperaba porque estos constructos tienen una pareja de unión inerte que se puede escindir mediante un sitio de escisión de MMP2 y dominios de variables anti-CD3E emparejables (un VH en 6248 y un VL en 6249). Los constructos 9327 y 9328 no generan una señal de FNy fuerte porque ninguno de estos constructos tiene un sitio de escisión entre la pareja de unión inerte y el dominio variable anti-CD3E.

Los constructos 9327 y 6248 no muestran ninguna actividad porque ambos tienen dominios VH para el anticuerpo anti-CD3E y no pueden producir un scFv anti-CD3E funcional; además, 9327 no tiene un sitio de escisión. 9327 y 6249 muestran un nivel de actividad muy bajo porque 9327 tiene sin sitio de escisión y 6249 tiene un sitio de escisión, pero los dos juntos pueden formar un scFv anti-CD3E si se produce algún nivel bajo de escisión espontánea.

En la Figura 14, el emparejamiento de los constructos 9334 y 9335 (que proporciona un enfoque biparatópico de direccionamiento a EGFR, con los scFv de anticuerpo de direccionamiento a diferentes epítopos en EGFR) no creó una señal de FNy. Se cree que los epítopos en EGFR estaban demasiado separados para que los dos dominios variables anti-CD3E se alcanzaran entre sí o el epítopo o los epítopos estaban demasiado cerca y creaban un impedimento estérico para la unión en el lado del anticuerpo. Sin embargo, es muy razonable someter al ensayo combinaciones biparatópicas. En este enfoque se puede identificar y someter a ensayo otro anticuerpo para EGFR para combinaciones.

La Figura 14 también muestra el direccionamiento de dos proteínas diferentes expresadas en la misma célula cancerosa. El constructo 6248 se une a EpCAM y se empareja de manera satisfactoria con 9335, que se une a EGFR. El constructo 6249 también se une a EpCAM y se empareja de manera satisfactoria con 9334. Esto establece que en una célula cancerosa se pueden dirigir diferentes moléculas, proporcionando una capa adicional de especificidad para algunas versiones del sistema de dos componentes que se describe en el presente documento. Esto también proporciona más evidencias de que los componentes 9335 y 9334 funcionan en otros contextos y sugiere además que estos componentes estaban demasiado cerca o demasiado lejos entre sí en su combinación entre sí descrita anteriormente.

En esta figura la combinación de 9334 y 6249 proporciona información útil, lo que demuestra que el direccionamiento doble se puede conseguir porque el constructo 9334 se dirige a EGFR y 9249 se dirige a EpCAM.

- 5 No se esperaba que la combinación de 9334 y 6248 tuviera actividad porque ambos constructos comprenden un VH del anticuerpo anti-CD3E y ningún constructor comprende un VL de ese anticuerpo.

I. Figura 15

- 10 Las células SNU398 se cultivaron en RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, glutamina 2 mM y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final de 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos (la concentración final de los constructos fue de 1 µg/ml por constructo). Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células SNU398 más linfocitos T sin adiciones, y células SNU398 sin linfocitos T u otras adiciones. Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy.
- 15
- 20

La Figura 15 muestra que la adición de un inhibidor de proteasa reduce la expresión de FNy del sistema de dos componentes que tiene un sitio de escisión de proteasa (constructos 6248 y 6249). El inhibidor de proteasa no influye en el constructor biespecífico 6245 ya que para la actividad no se requieren escisiones ni emparejamientos.

- 25
- J. Figura 16

- 30 Las células SW620 se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en placas en una placa de 96 pocillos (100.000 células por pocillo) el día antes del experimento. El día del experimento el medio se aspiró y se descartó. Se añadieron 20.000 linfocitos T en medio de linfocitos T. Los constructos (concentración final de 1 µg/ml) se prepararon en medio de linfocitos T y se añadieron al cultivo. Cuando se usaron mezclas de constructos, estas se mezclaron previamente antes de la adición a los cultivos (la concentración final de los constructos fue de 1 µg/ml por constructo). Los controles fueron PHA-M ((concentración final de 10 µg/ml), células SW620 más linfocitos T sin adiciones, y células SW620 sin linfocitos T u otras adiciones.
- 35
- 40 Cada condición se desarrolló por triplicado. El volumen final en el cultivo fue de 200 pl por pocillo. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa de un 100 %. El cultivo se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes se aspiraron y se colocaron en una placa separada. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron para determinar el FNy.
- 45 La combinación funcional de 9335 y 6248 muestra que diferentes tipos de fragmentos de anticuerpos se pueden combinar en un primer componente y un segundo componente, respectivamente. 9335 emplea un VHH anti-EGFR como resto de direccionamiento y 6248 emplea un scFv anti-EPCAM como resto de direccionamiento.

Ejemplo 4. Direccionamiento *in vivo* de linfoma de linfocitos B mediante un sistema de dos componentes

- 50 Un sistema de dos componentes que comprende un primer componente y un segundo componente se administra a un paciente que tiene linfoma. El primer componente comprende Rituximab o un anticuerpo anti-CD22 como resto de direccionamiento, un dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 como dominio de acoplamiento de linfocitos T, un dominio VL como pareja de unión inerte y el sitio de escisión de ADAM28, KPAKFFRL. El segundo componente también comprende Rituximab o un anticuerpo anti-CD22 como resto de direccionamiento, el dominio VL complementario de un anticuerpo que se une a CD3 como dominio de acoplamiento de linfocitos T, VH como una pareja de unión inerte, y el sitio de escisión de ADAM28, KPAKFFRL. El dominio VH de un anticuerpo que se une a CD3 como dominio de acoplamiento de linfocitos T del primer componente y el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD3 como un dominio de acoplamiento de linfocitos T del segundo componente son capaces de unirse entre sí cuando no se unen a una pareja de unión inerte y que posee la actividad para acoplarse a un linfocito T.
- 55

- 60 El paciente recibe una infusión del agente, que se dirige a todos los linfocitos B, sanos y malignos. Después de unirse a las células malignas, el agente entra en contacto con proteasas, de modo que la escisión del dominio de reconocimiento de proteasa libere las parejas de unión inerte del primer y segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T.

- 65 Los linfocitos B malignos que están unidos por el complejo del sistema de dos componentes ahora activado atraen al sistema inmunitario del hospedador para citólisis por linfocitos T debido a la presencia y actividad del complejo del primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T.

Ejemplo 5. Ejemplos específicos de sistemas de dos componentes

Un sistema de dos componentes elegido del Sistema A-E se prepara de acuerdo con la Tabla 3 y se administra a un paciente que tiene cáncer. Si un artículo se describe como opcional, la fila de la tabla describe ambos sistemas de dos componentes que tienen o no ese artículo.

5

Tabla 6: Ciertos ejemplos del sistema de dos componentes

Primer componente					
A	Resto de direccionamiento	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión	Pareja de unión inerte	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a HER2	V _H de anticuerpo que se dirige a CD3	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el VL del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
Segundo componente					
	Resto de direccionamiento opcional	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión opcional	Pareja de unión inerte opcional	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a HER2	V _L de anticuerpo que se dirige a CD3	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el VL del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
B	Primer componente				
	Resto de direccionamiento	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión	Pareja de unión inerte	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a EGFR, tal como Cetuximab	V _H de anticuerpo que se dirige a CD4	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el VL del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
Segundo componente					
	Resto de direccionamiento opcional	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión opcional	Pareja de unión inerte opcional	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a EGFR, tal como Cetuximab	V _L de anticuerpo que se dirige a CD4	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el VL del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).

(continuación)

Tabla 6: Ciertos ejemplos del sistema de dos componentes

C Primer componente					
C	Resto de direccionamiento	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión	Pareja de unión inerte	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a CD20, tal como Rituximab	V _H de anticuerpo que se dirige a CD8	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el V _L del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el V _L del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
D Segundo componente					
D	Resto de direccionamiento opcional	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión opcional	Pareja de unión inerte	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a CD20, tal como Rituximab	V _L de anticuerpo que se dirige a CD8	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el V _L del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el V _L del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
E Primer componente					
E	Resto de direccionamiento	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión	Pareja de unión inerte	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a CD22, tal como Inotuzumab	V _H de anticuerpo que se dirige a CD28	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el V _L del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el V _L del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
Segundo componente					
E	Resto de direccionamiento opcional	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión opcional	Pareja de unión inerte	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a CD22, tal como Inotuzumab	V _L de anticuerpo que se dirige a CD28	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el V _L del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el V _L del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
				sin crear ninguna especificidad de unión	de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el V _L del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).
E Primer componente					
E	Resto de direccionamiento	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión	Pareja de unión inerte	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
	Anticuerpo que se dirige a CD33, tal como Gemtuzumab	V _H de anticuerpo que se dirige a receptor de linfocitos T (TCR)	Cualquier sitio de escisión de ADAM28	Cualquier dominio V _H que se une al dominio VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el V _H y el V _L del resto de direccionamiento, entre el resto de direccionamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el V _H y el V _L del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).

(continuación)

Tabla 6: Ciertos ejemplos del sistema de dos componentes

Segundo componente				
Resto de direccionamiento opcional	Resto de acoplamiento de linfocitos T	Sitio de escisión opcional	Pareja de unión inerte opcional	Conector o conectores y ubicación o ubicaciones opcionales
Anticuerpo que se dirige a CD33, tal como Gemtuzumab	VL de anticuerpo que se dirige a receptor de linfocitos T (TCR)	Cualquier sitio de escisión de ADAM28 T	Cualquier dominio VH que se une al dominio VI del dominio de acoplamiento de linfocitos T sin crear ninguna especificidad de unión	Por ejemplo, GGGGS (SEQ ID NO: 45). Situado entre el VH y el VL del resto de direcciónamiento, entre el resto de direcciónamiento y el dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo, y/o entre el VH y el VL del dominio de acoplamiento de linfocitos T inactivo (Véase la Figura 1).

EQUIVALENTES

- 5 La memoria descriptiva escrita anteriormente se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica las realizaciones de la invención. La descripción mencionada anteriormente y los Ejemplos detallan ciertas realizaciones de la invención y otras divulgaciones, y describe el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa lo detallado que pueda aparecer en el texto lo mencionado anteriormente, la realización se puede poner en práctica de muchas formas y se debería interpretar de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, el término aproximadamente se refiere a un valor numérico, que incluye, por ejemplo, números enteros, fracciones y porcentajes, indicados de forma explícita o no. El término aproximadamente generalmente se refiere a un intervalo de valores numéricos (por ejemplo, +/- 5-10 % del intervalo mencionado) que alguien con la experiencia habitual en la materia podría considerar equivalente al valor mencionado (por ejemplo, que tenga la misma función o resultado). Cuando los términos tales como al menos y aproximadamente preceden a un listado de valores o intervalos numéricos, los términos modifican todos los valores o intervalos que se proporcionan en el listado. En algunos casos, el término aproximadamente puede incluir valores numéricos que se redondean a la cifra significativa más cercana.

REIVINDICACIONES

1. Un kit o composición para uso en el tratamiento de cáncer en donde el kit o composición comprende:
 - a. un primer componente que comprende un agente de acoplamiento de linfocitos T dirigido que comprende:
 - i. un primer resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a células cancerosas en donde el primer resto de direccionamiento es un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo;
 - ii. un primer dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T cuando se une a un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no es parte del primer componente, y en donde el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH o VL;
 - iii. una primera pareja de unión inerte para el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T que se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T de modo que el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T no se una al segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la primera pareja de unión inerte en donde, si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH, la primera pareja de unión inerte es un dominio VL y, si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, la primera pareja de unión inerte es un dominio VH; y
 - iv. un primer sitio de escisión de proteasa que separa el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T y la primera pareja de unión inerte, en donde el primer sitio de escisión de proteasa es capaz de liberar la primera pareja de unión inerte del dominio de acoplamiento de linfocitos T en presencia de una proteasa expresada por las células cancerosas.
 - b. un segundo componente que comprende un agente de acoplamiento a linfocitos T dirigido que comprende:
 - i. un segundo resto de direccionamiento que es capaz de dirigirse a células cancerosas en donde el segundo resto de direccionamiento es un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo;
 - ii. un segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T capaz de actividad de acoplamiento de linfocitos T cuando se une al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T, en donde el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T, cuando se emparejan entre sí, son capaces de unirse a CD3 o al receptor de linfocitos T (TCR) cuando ninguno está unido a una pareja de unión inerte y además en donde si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH, el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, y si el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VL, el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T es un dominio VH;
 - iii. una segunda pareja de unión inerte para el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T que se une al segundo dominio de segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T de tal manera que el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T no se una al primer dominio de acoplamiento de linfocitos T a menos que se retire la segunda pareja de unión inerte, en donde si el segundo dominio de unión a linfocitos T es un dominio VH, la segunda pareja de unión inerte es un dominio VL y si el segundo dominio de unión a linfocitos T es un dominio VL, la segunda pareja de unión inerte es un dominio VH; y
 - iv. un segundo sitio de escisión de proteasa que separa el segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T y la segunda pareja de unión inerte, en donde el segundo sitio de escisión de proteasa es capaz de liberar la segunda pareja de unión inerte del segundo dominio de acoplamiento de linfocitos T en presencia de una proteasa expresada por las células cancerosas,
- en donde la escisión del segundo sitio de escisión de proteasa causa la pérdida de la segunda pareja de unión inerte y la complementación con el primer dominio de acoplamiento de linfocitos T del kit o la composición.
2. El kit o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer y el segundo restos de direccionamiento son diferentes.
3. El kit o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los sitios de escisión de proteasa del primer componente y del segundo componente son diferentes.
4. Un conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifican el primer y el segundo componentes del kit o composición de la reivindicación 1.
5. El kit o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es uno cualquiera de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer renal, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, leucemia, mieloma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, trastorno linfoproliferativo, trastorno mielodisplásico, enfermedad mieloproliferativa o enfermedad premaligna.
6. El kit o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el kit o composición dirige una respuesta inmunitaria de un paciente a células cancerosas.

ES 2 873 846 T5

7. El kit o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer y el segundo dominios de acoplamiento de linfocitos T son capaces de formar un scFv.

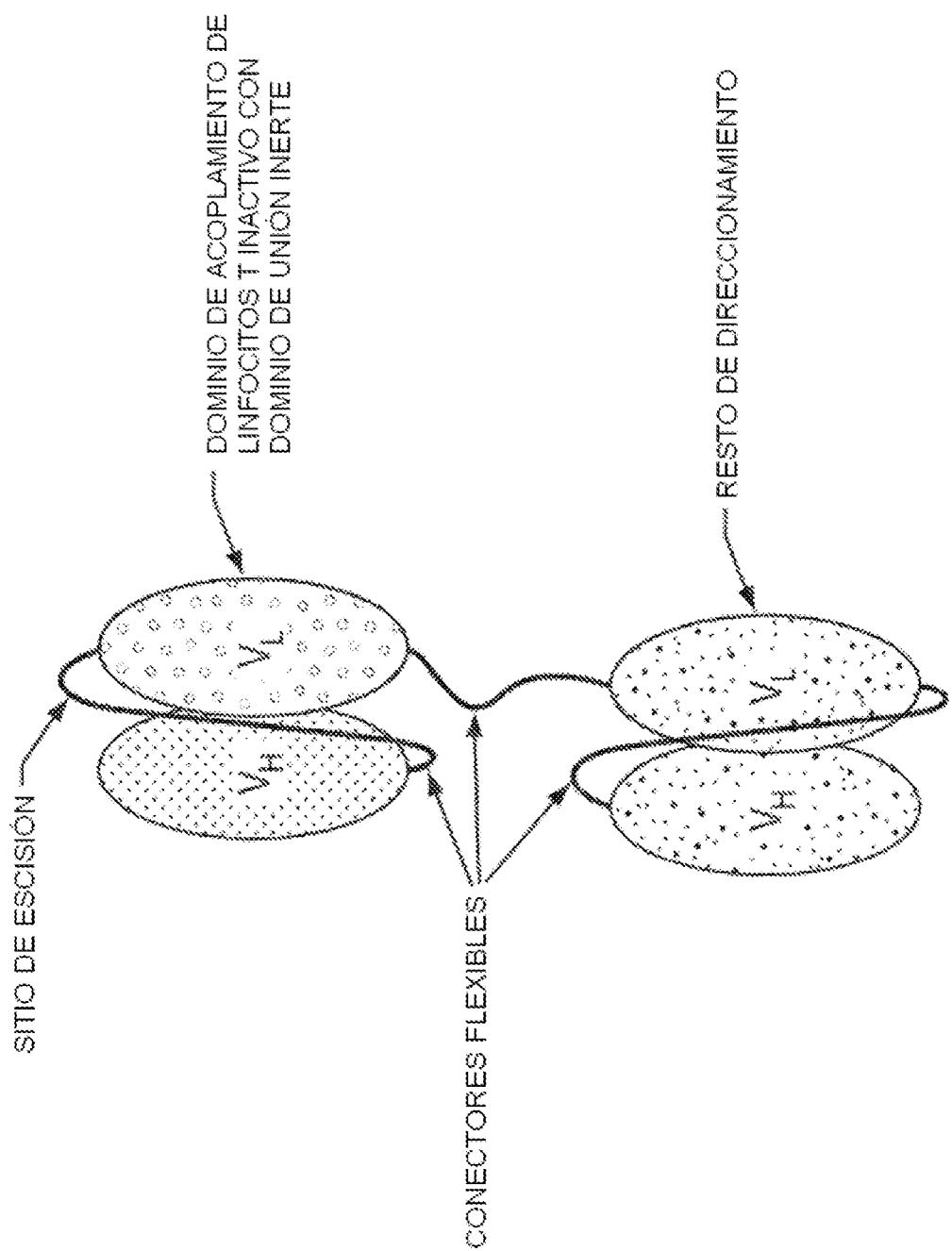


FIGURA 1

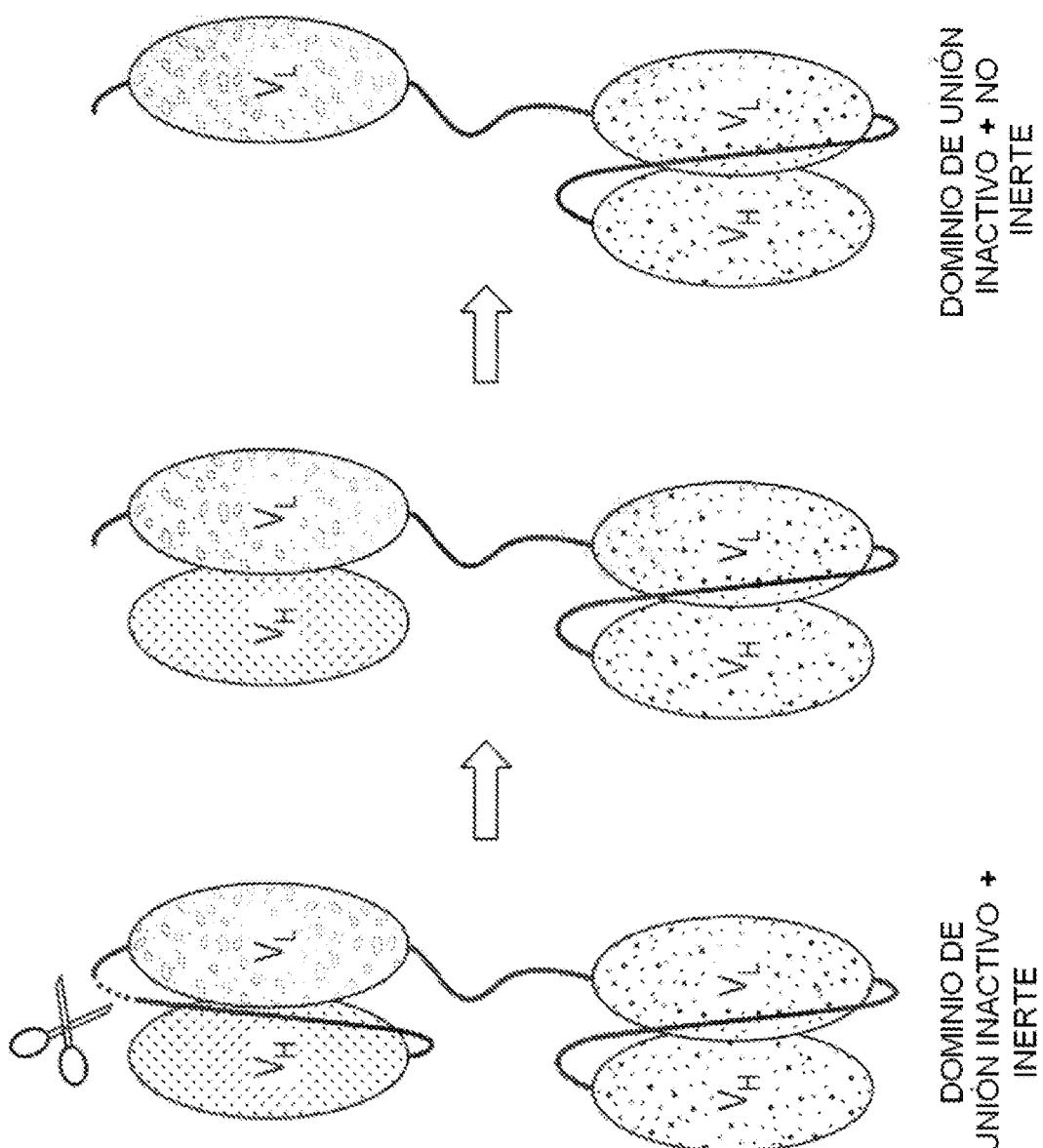


FIGURA 2

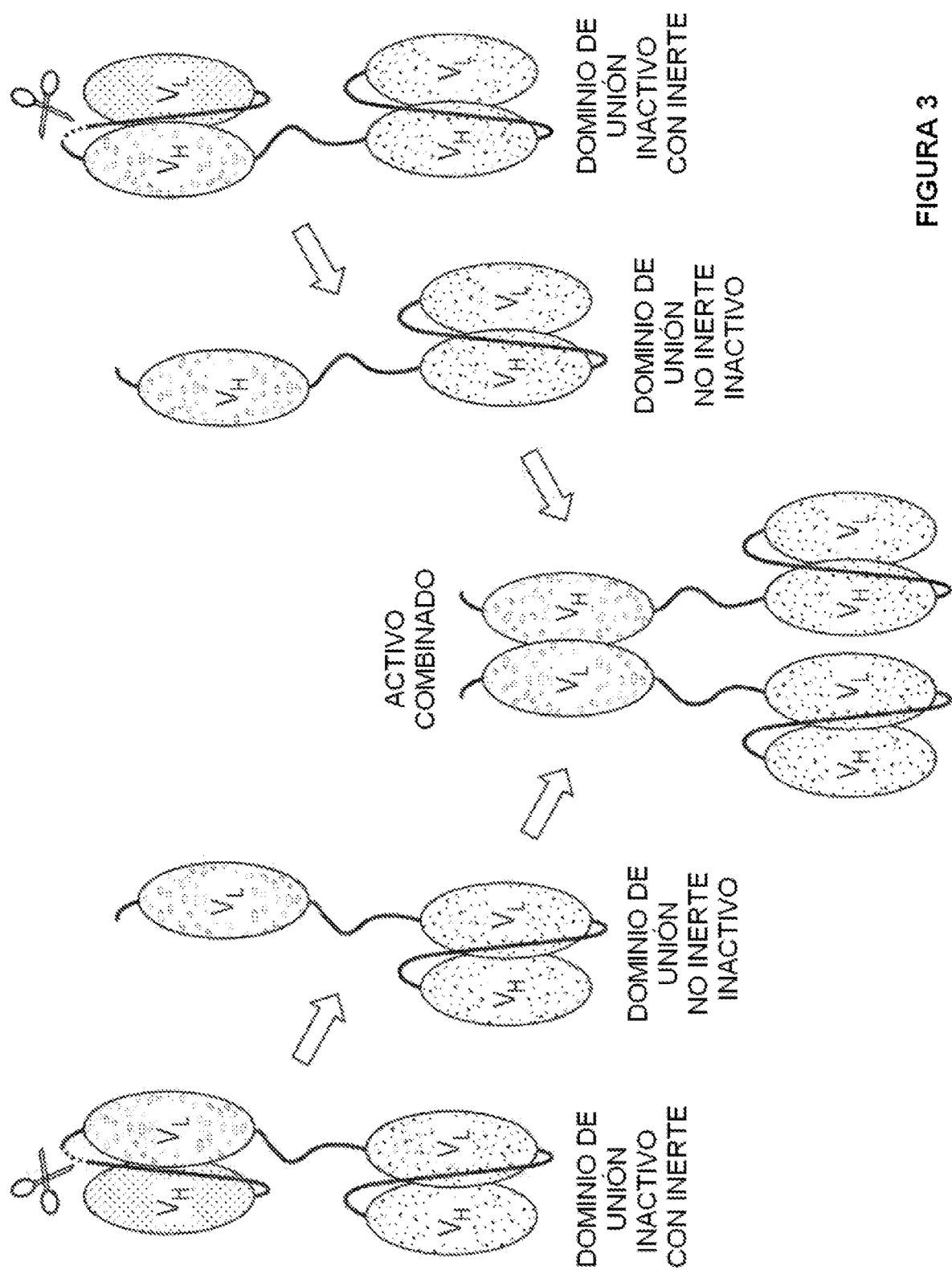


FIGURA 3

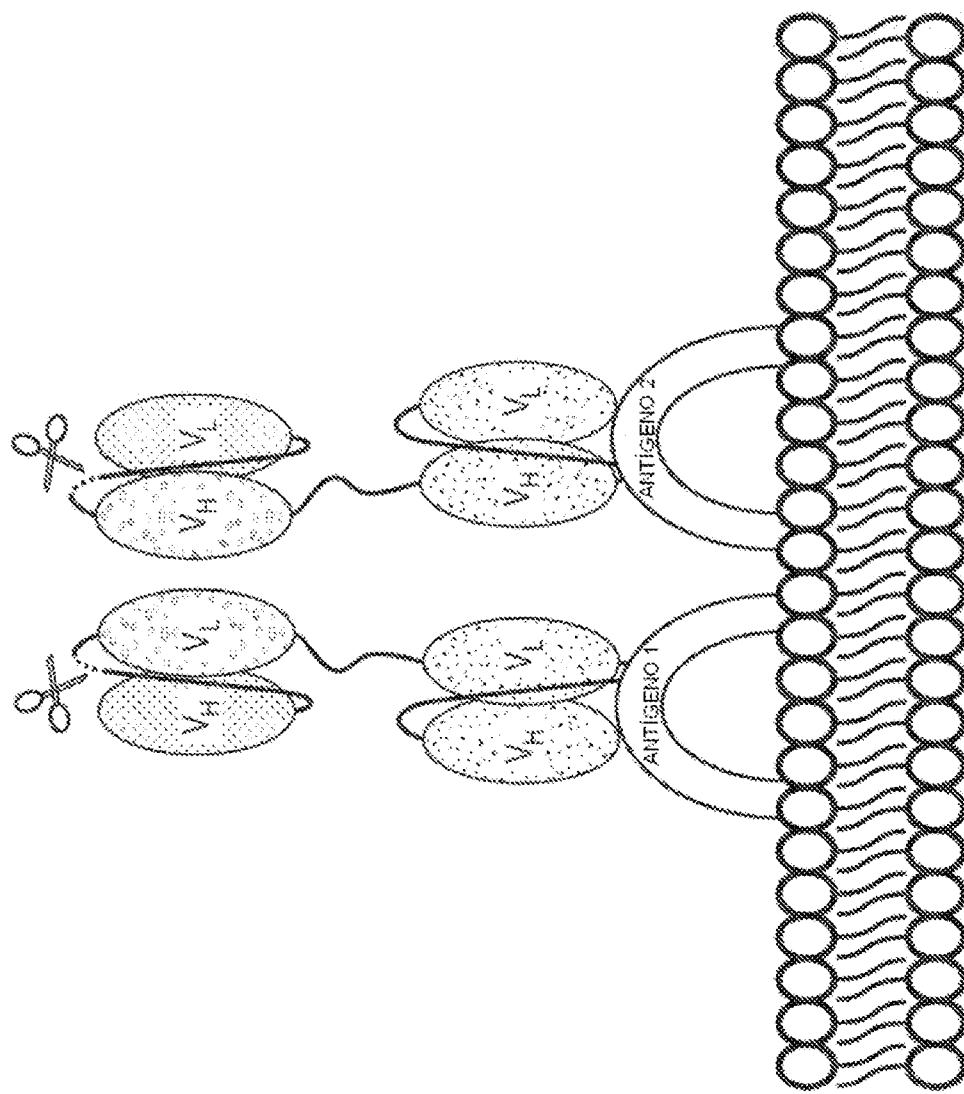


FIGURA 4A

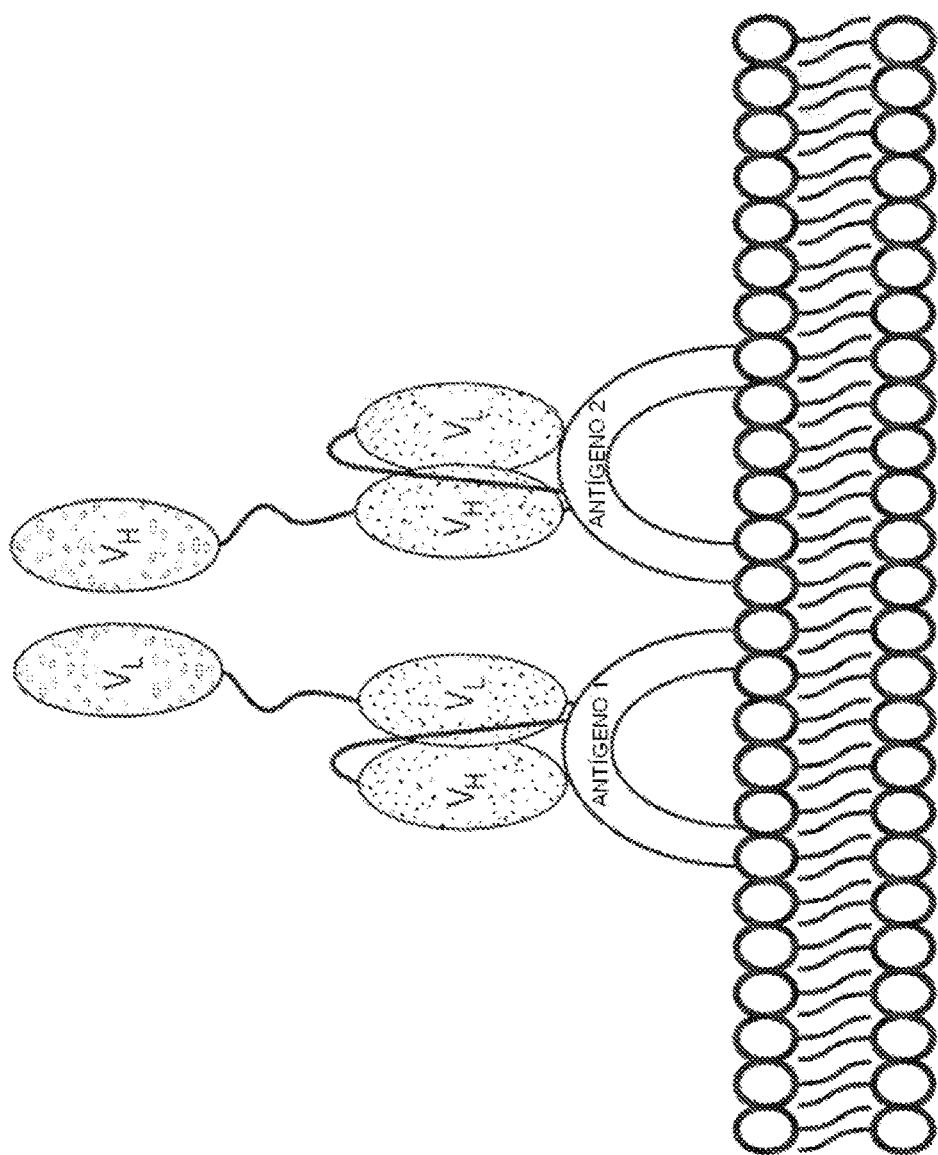


FIGURA 4B

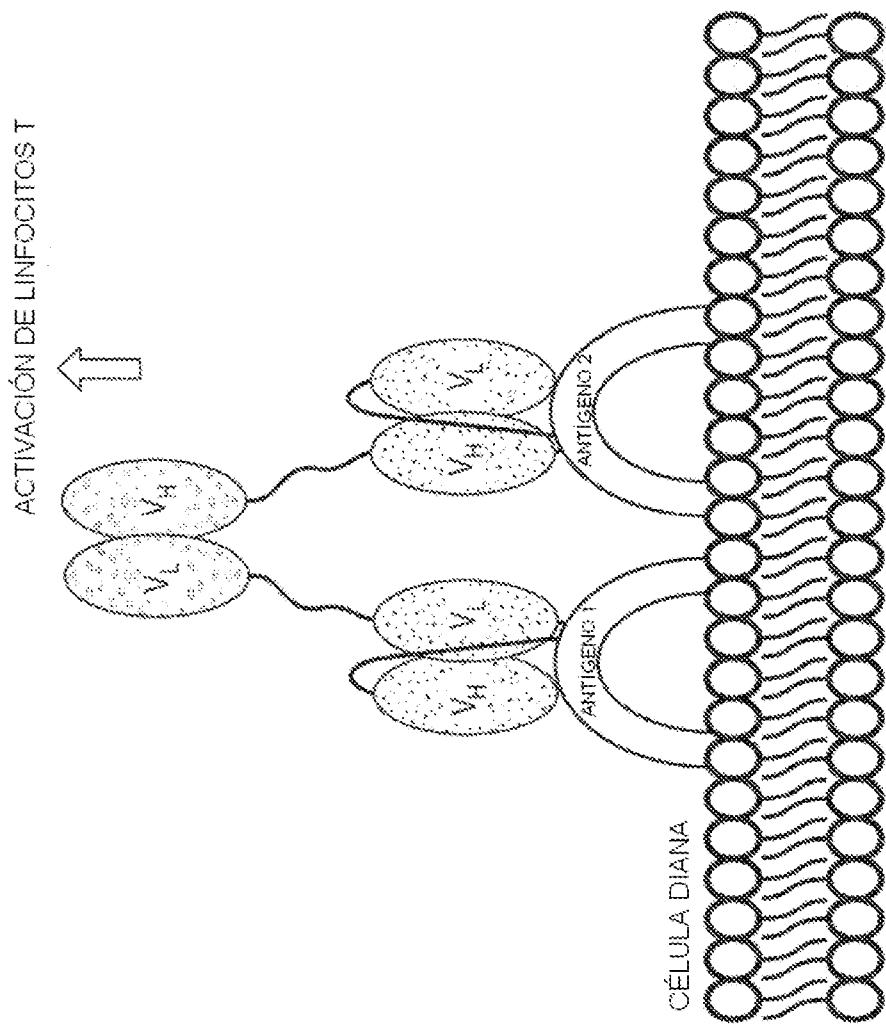


FIGURA 4C

FIGURA 5A

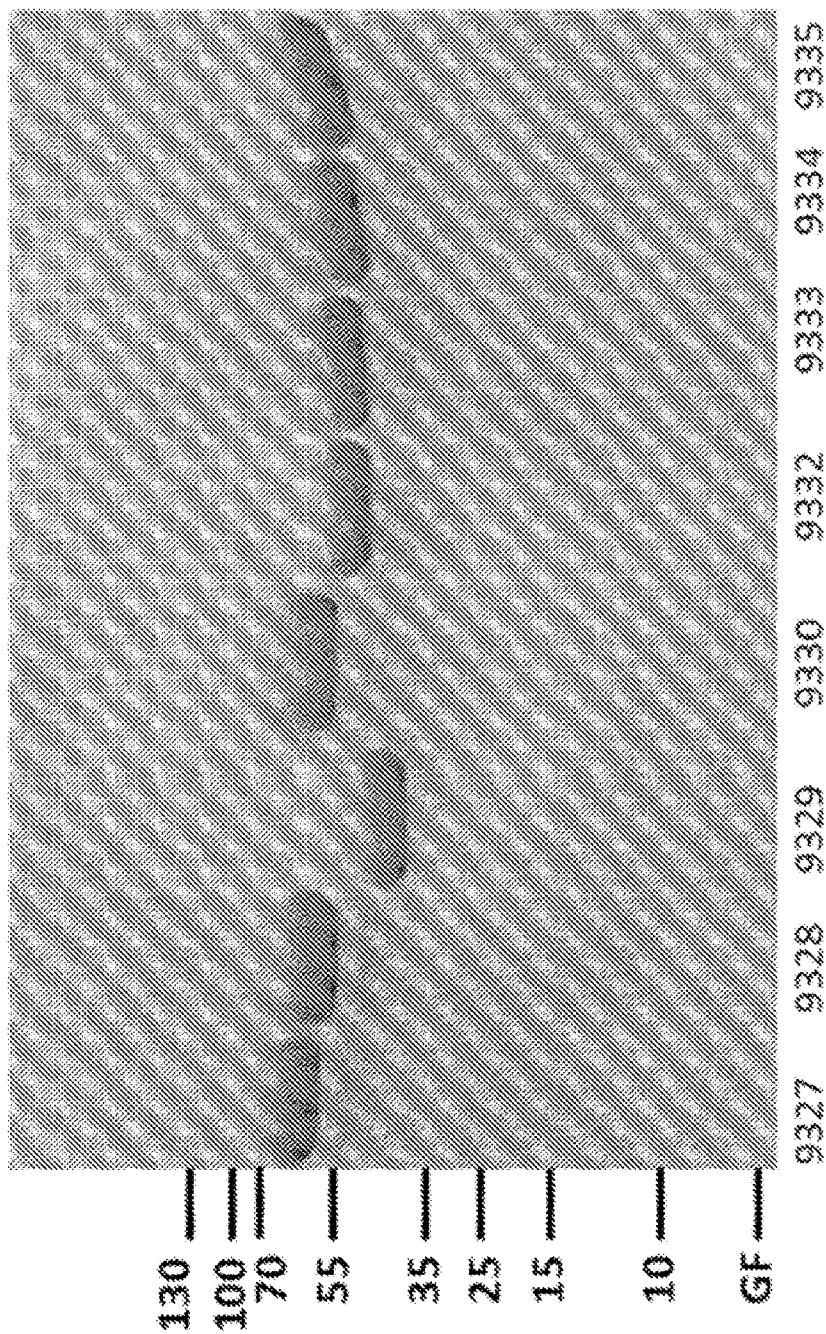


FIGURA 5B

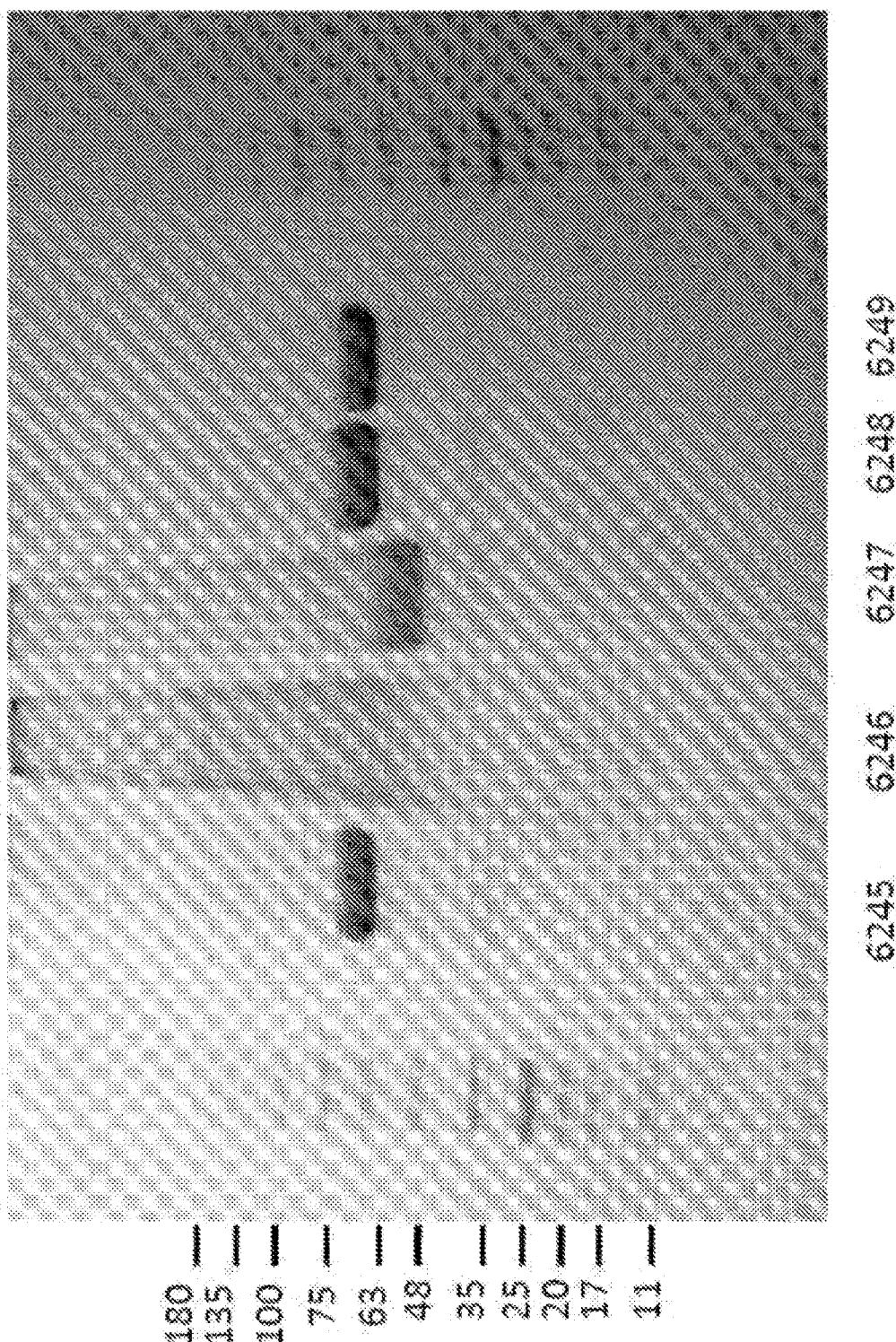


FIGURA 6

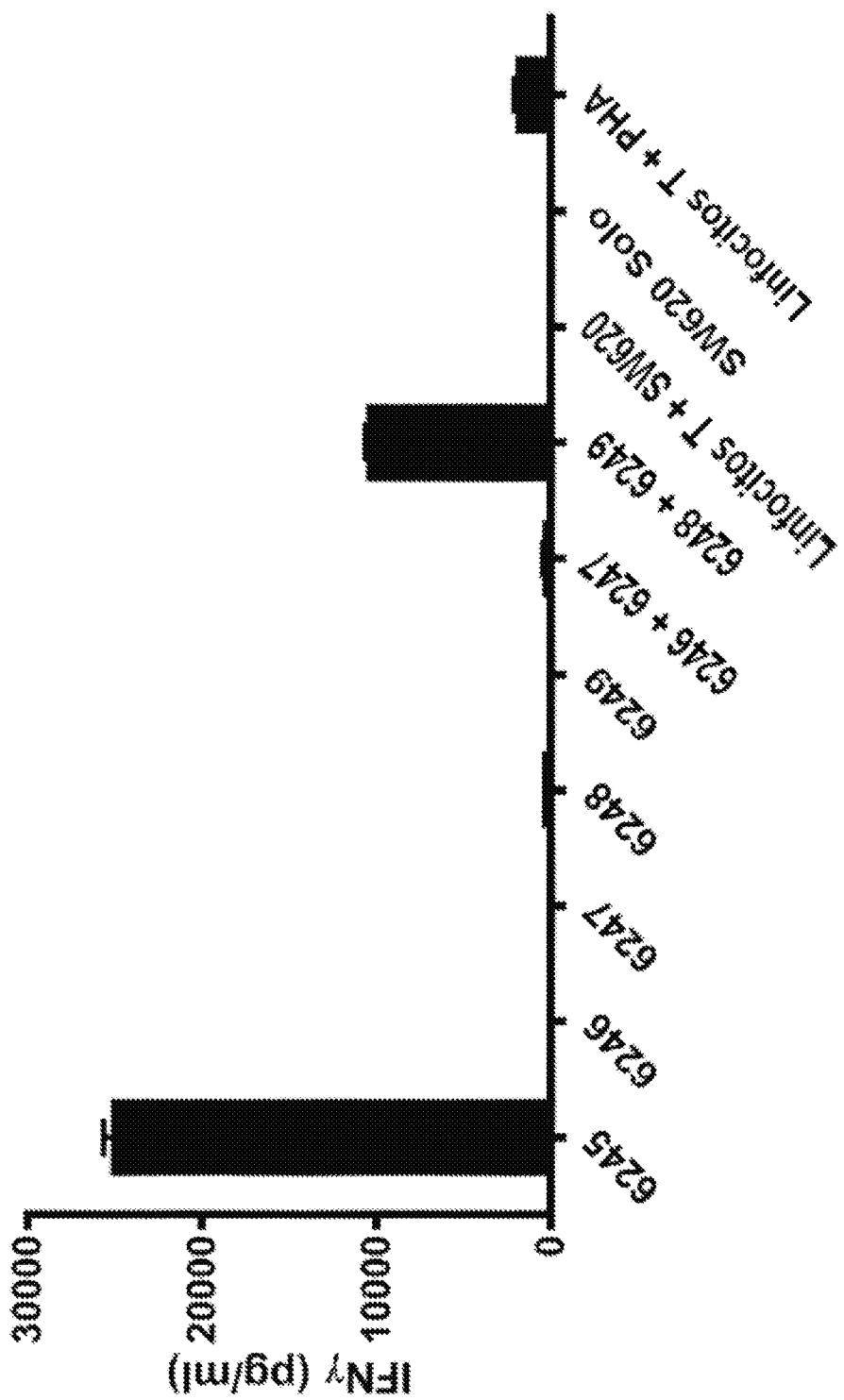


FIGURA 7

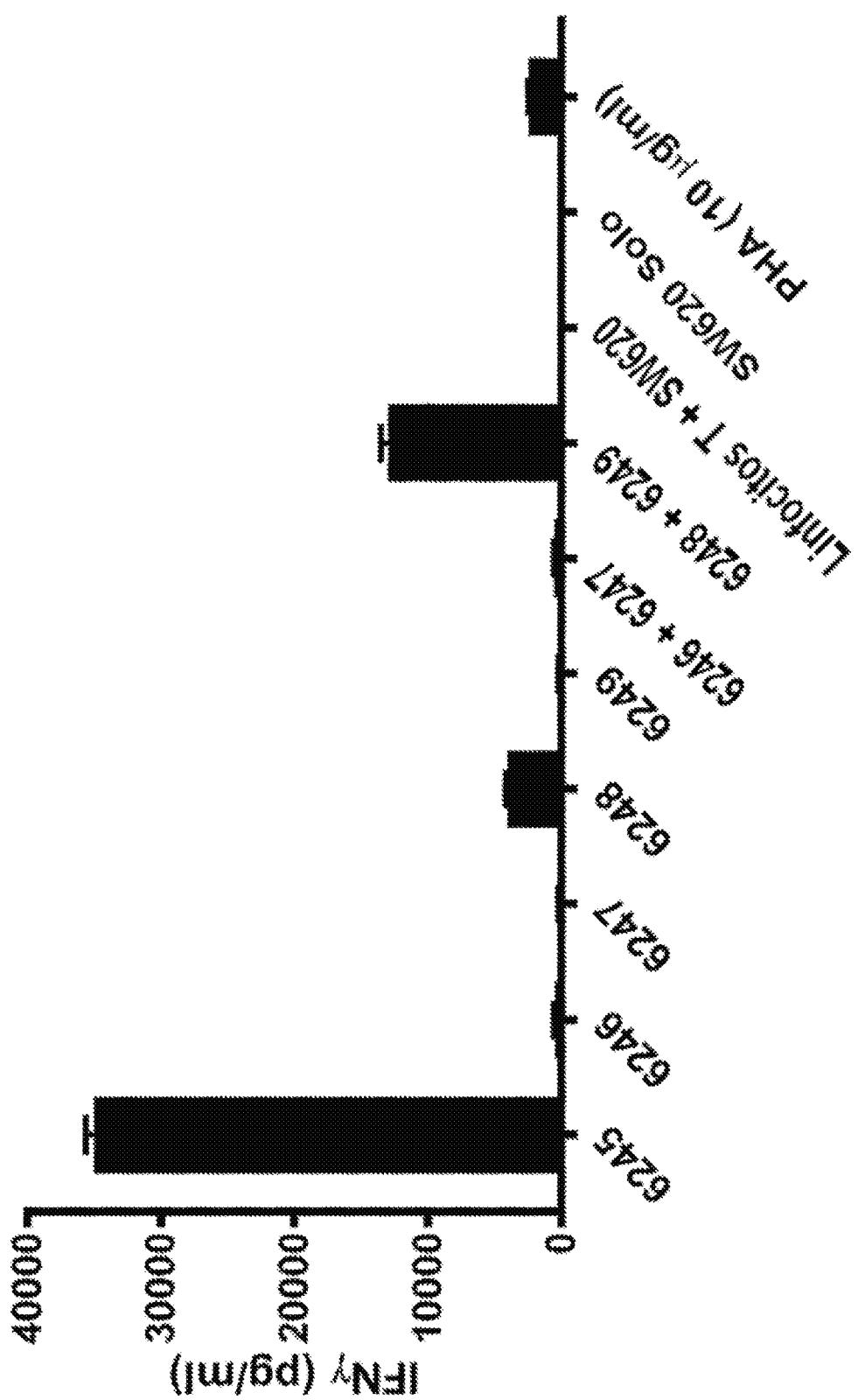
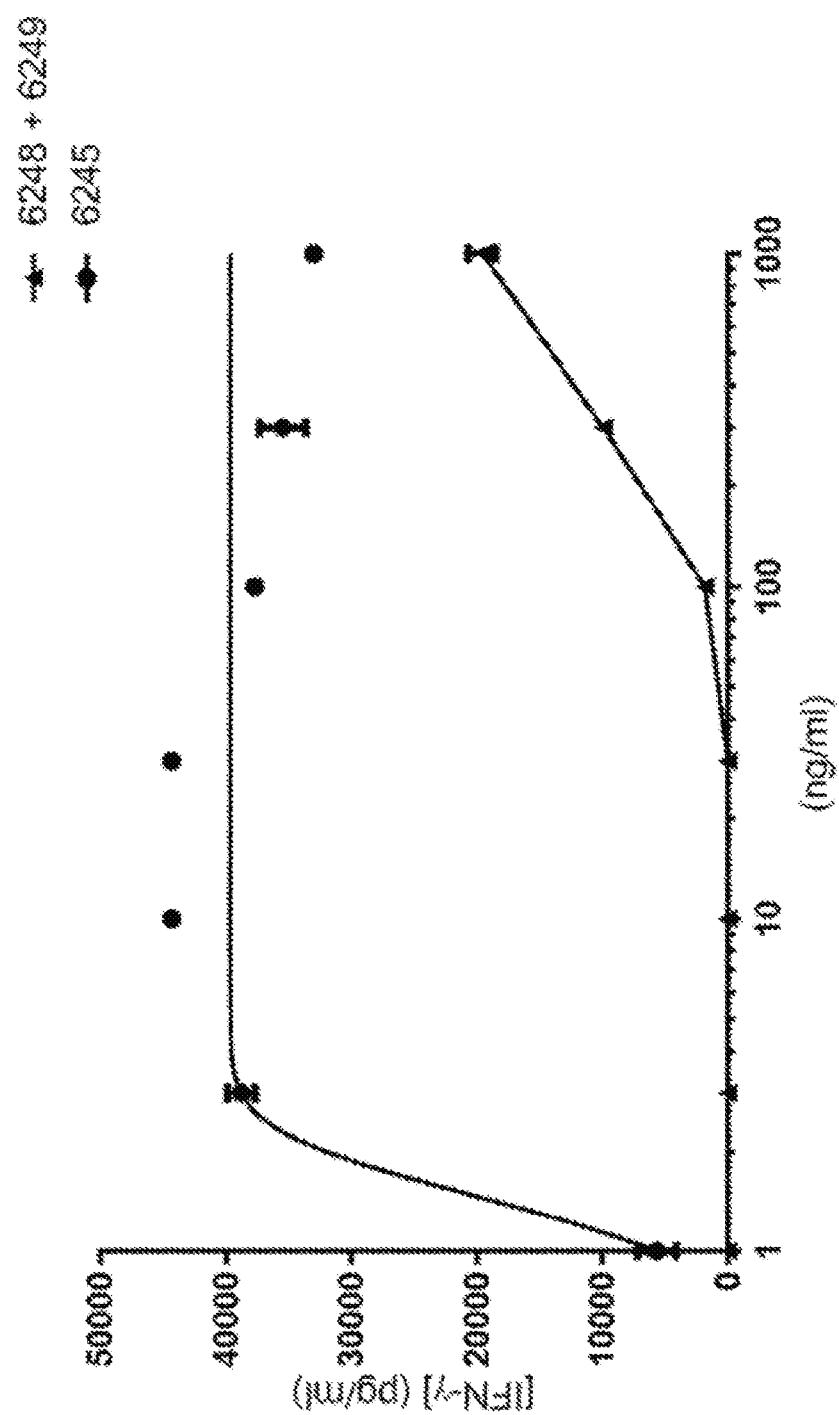


FIGURA 8



FIGURAS 9A-B

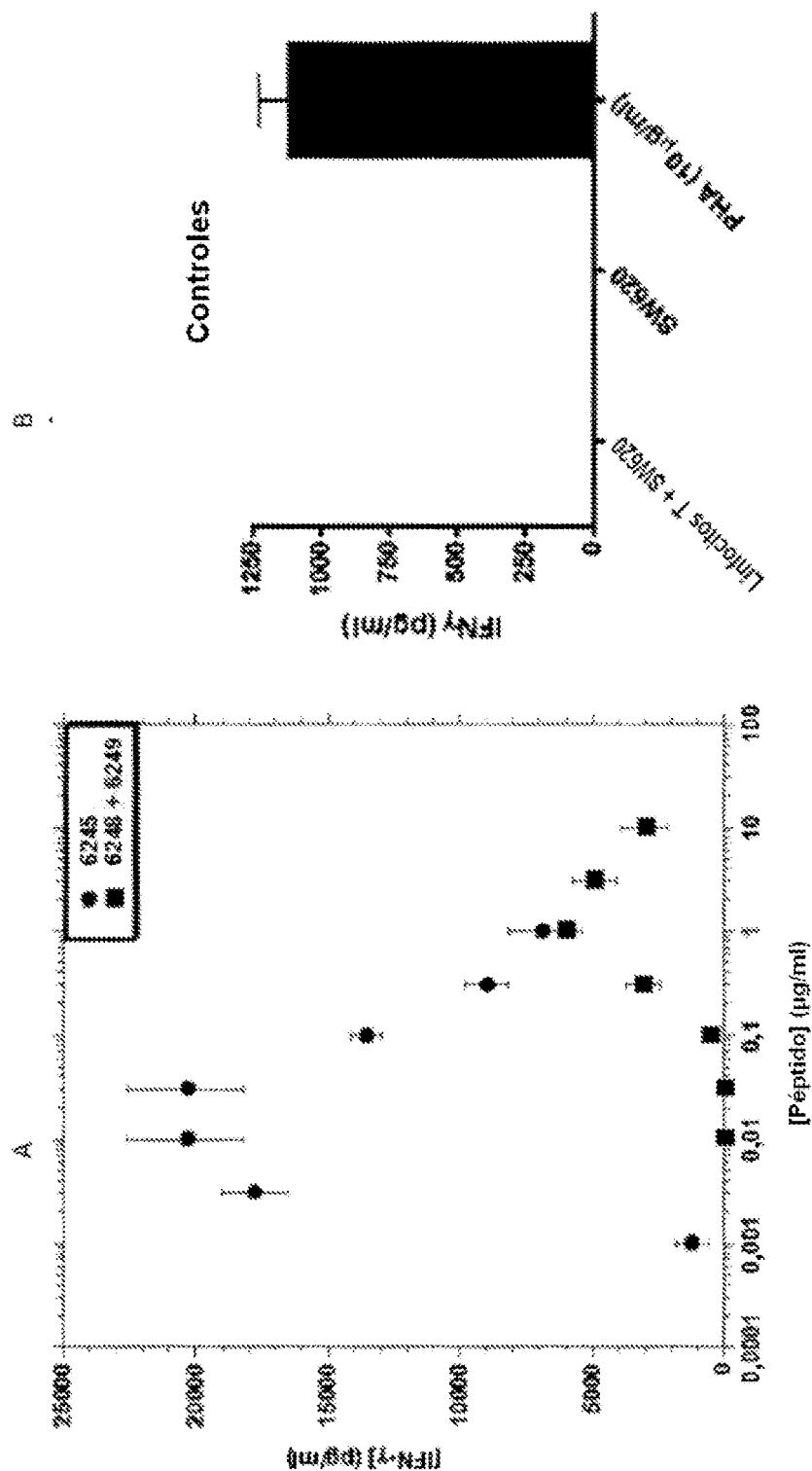


FIGURA 10

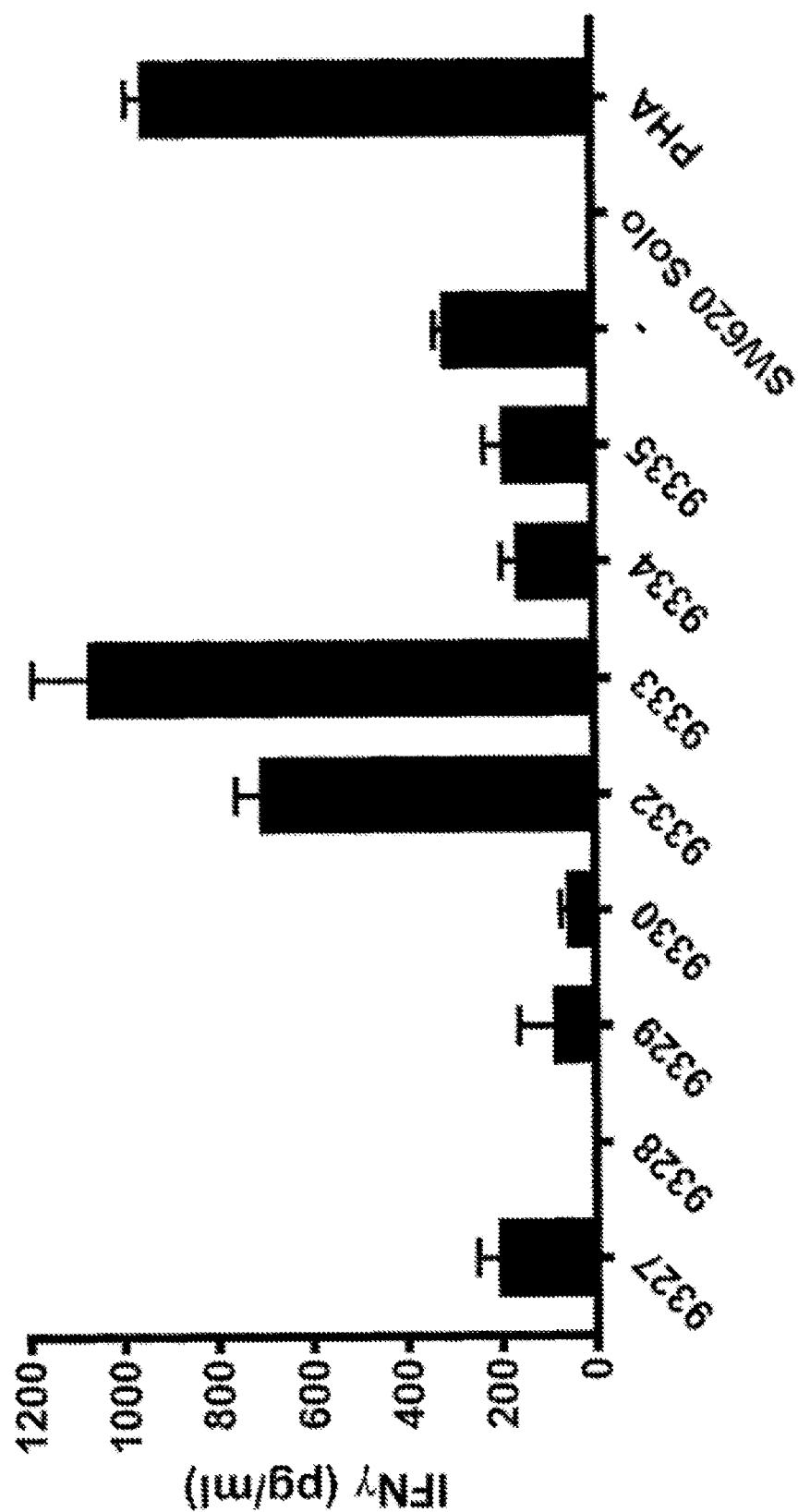


FIGURA 11

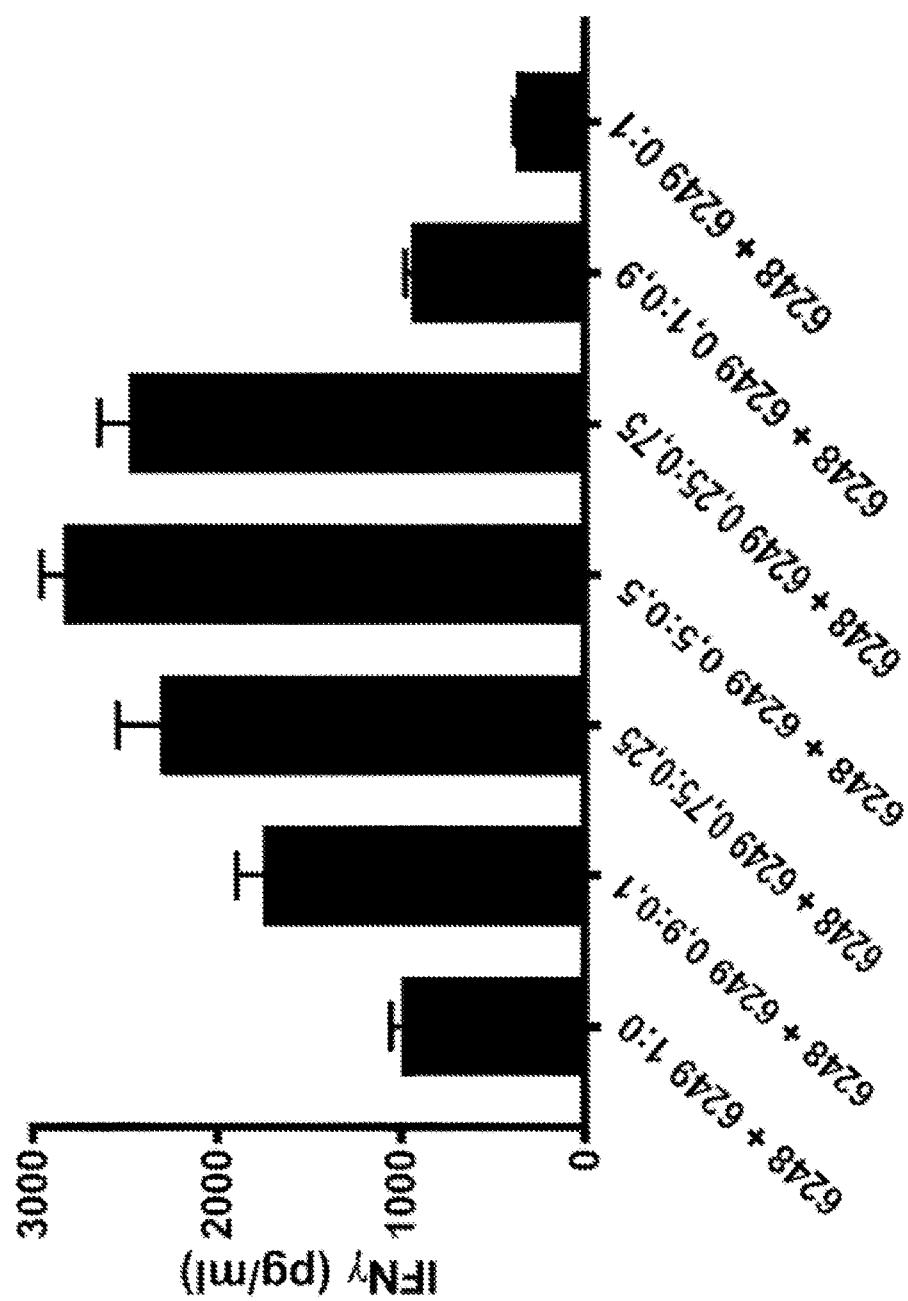


FIGURA 12

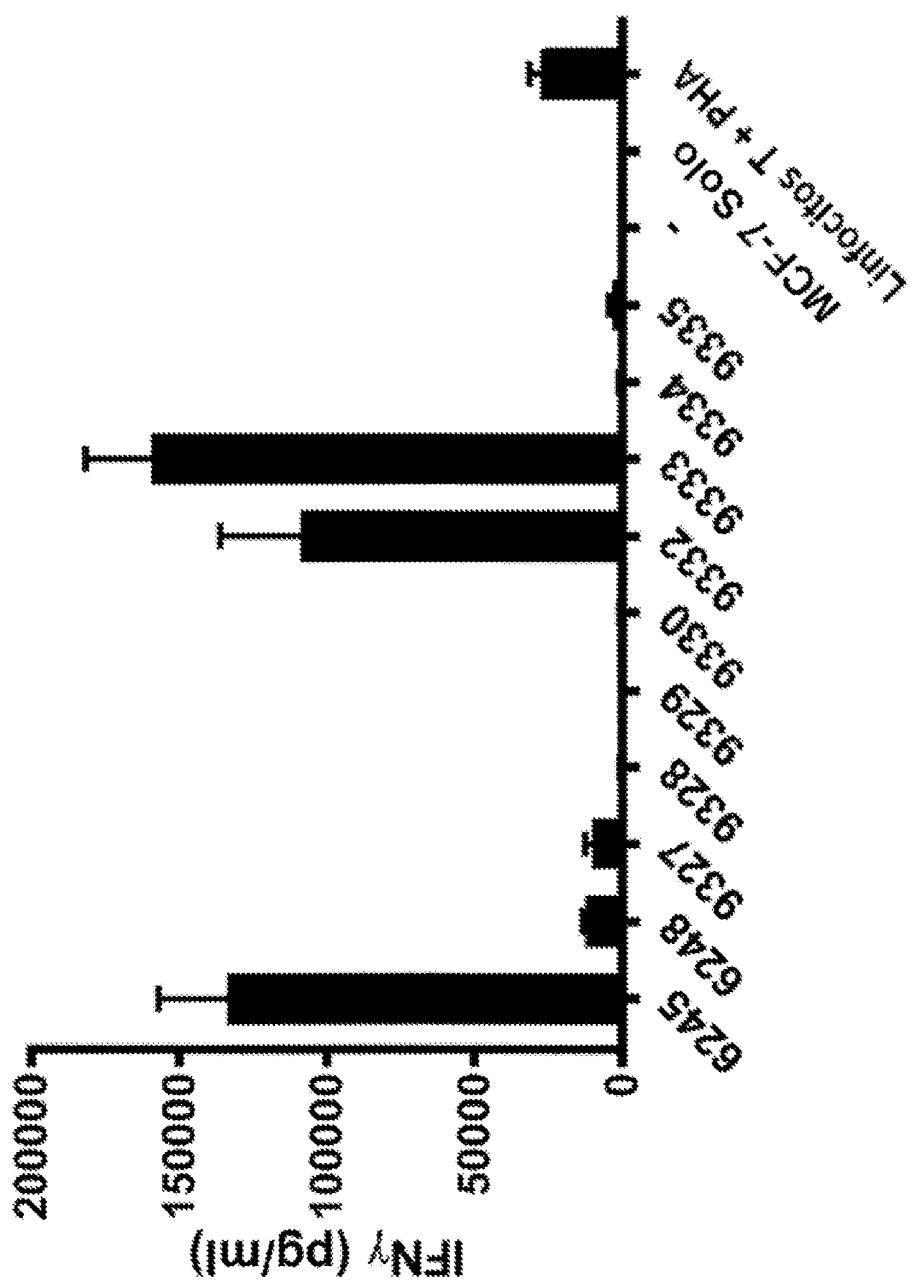


FIGURA 13

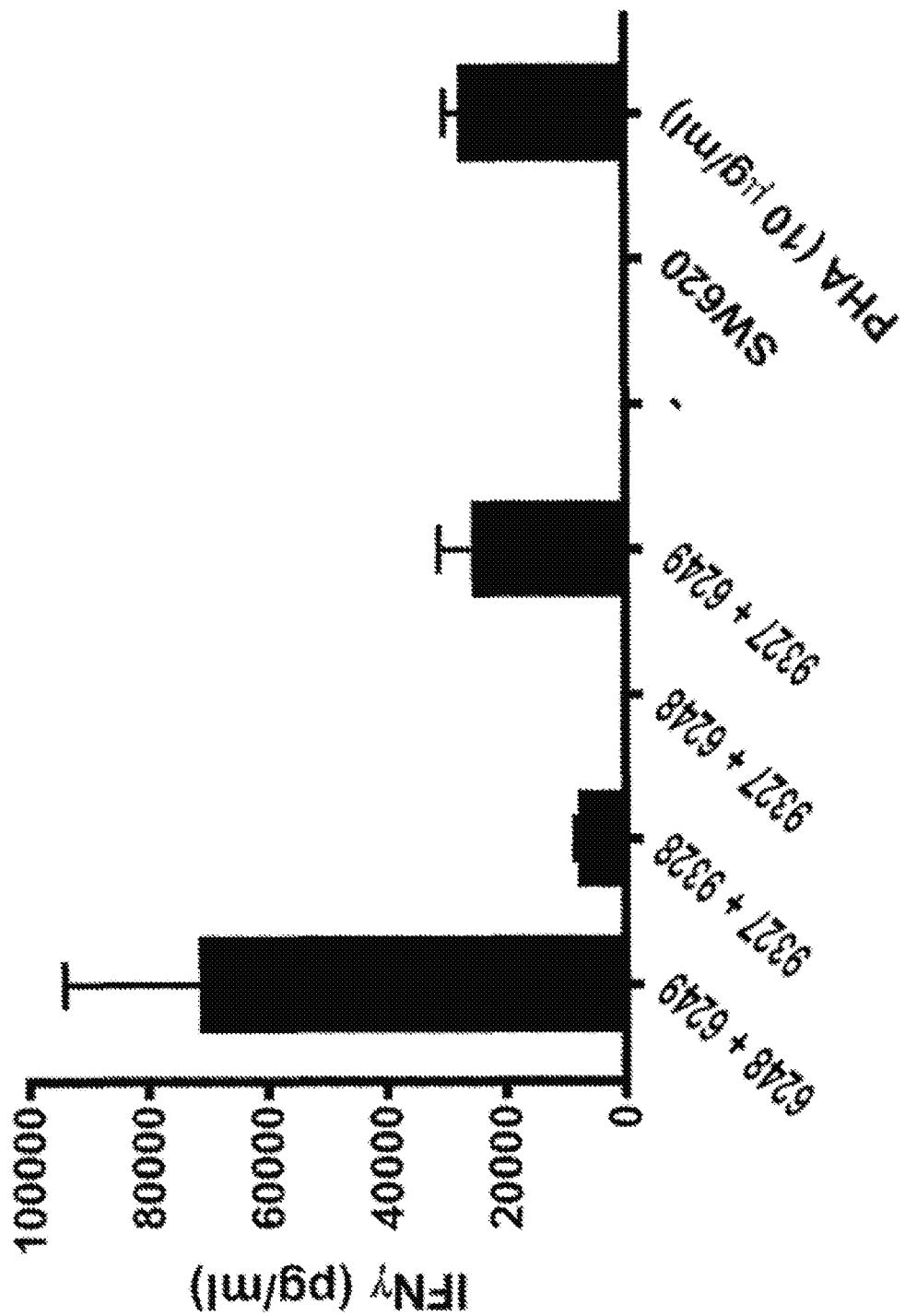


FIGURA 14

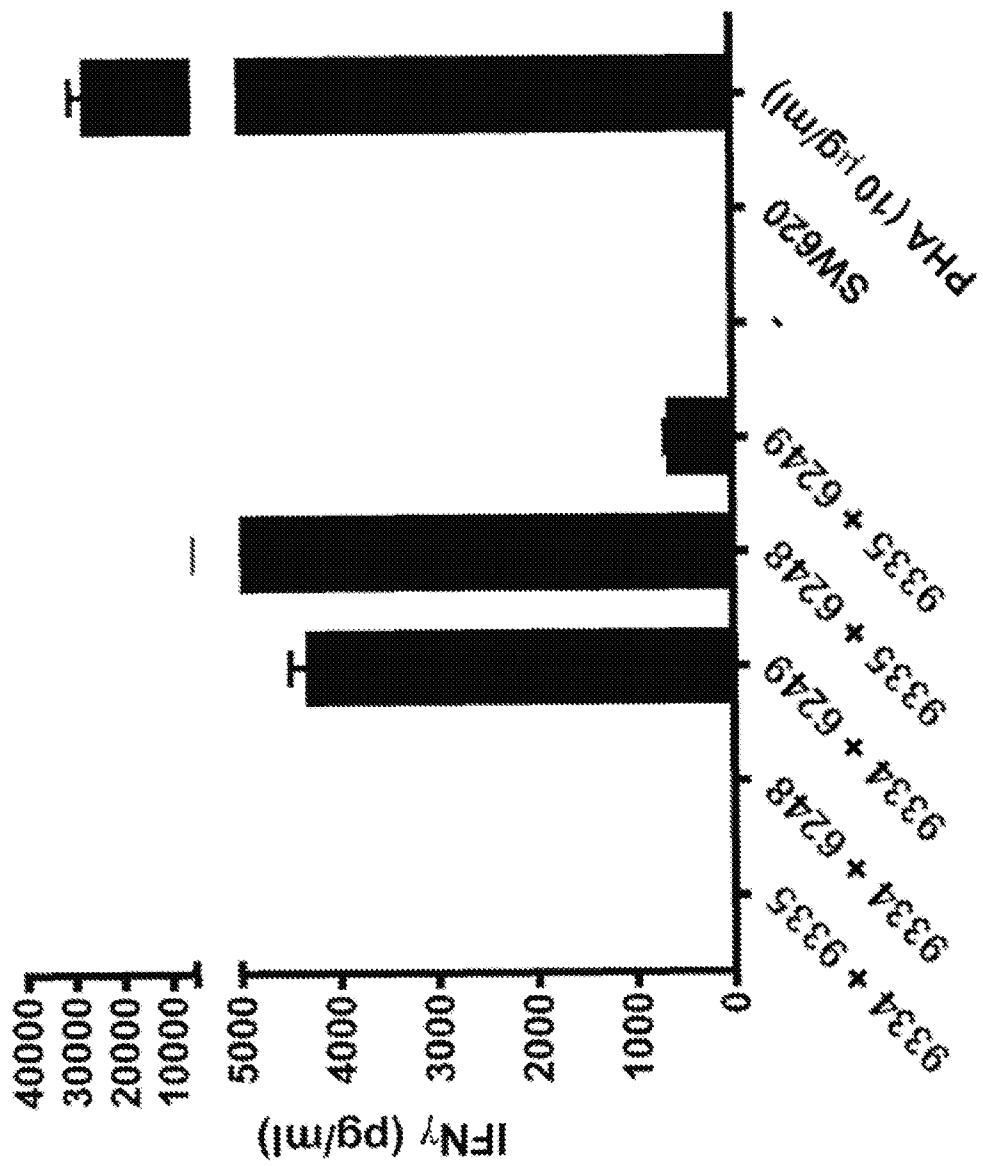


FIGURA 15

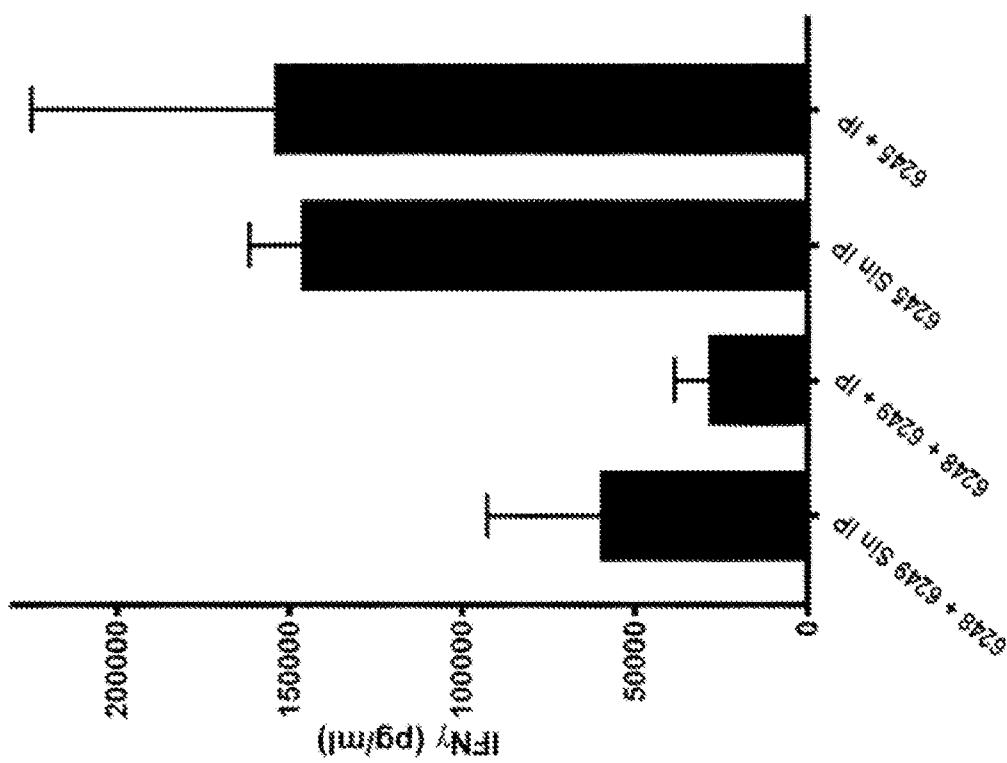


FIGURA 16

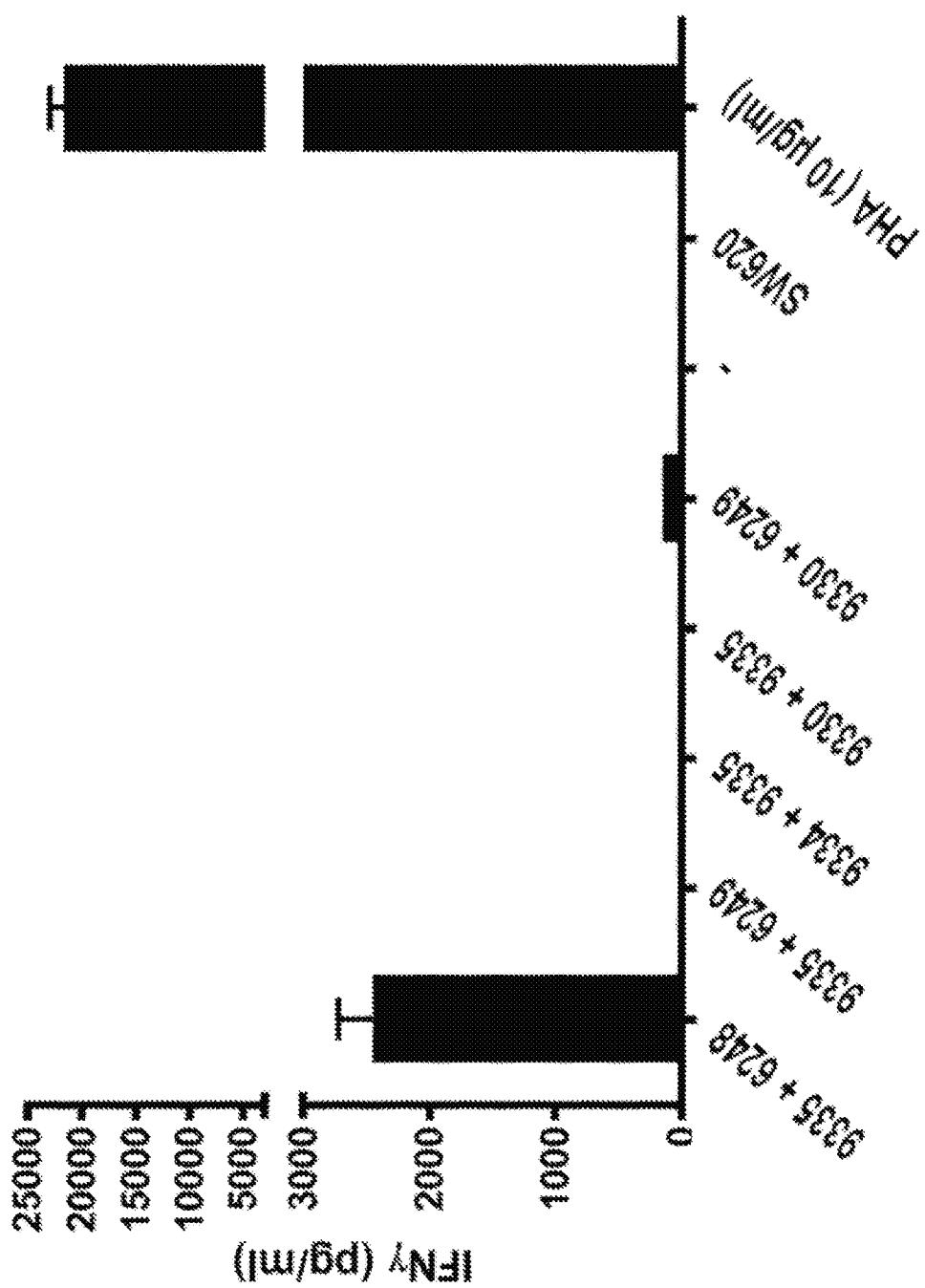


FIGURA 17

scFv EPCAM 6249 (V₁ CONECTOR scFv (V₂) CONECTOR ESCINDIBLE
 V₁ Inerte Anti-CD3ε) etiqueta de hexahistidina (Sítio de escisión de MMP2 en negrito y subrayado)

ELVMTQSPSSLTIVTAGEKVTMSCKSSQSILLNSGNQKNYLTVYQQKPGOPPKLIIWASTRESGVPDR
 FTGSGSGSTDEFLTISSVKISCKASGYAFTNYWIKVQRPGHGLEWIGDIFPGSGNTHYNEKEFKGKATLTA
 DKSSSTAYMQLSSLTFFEDSAVYFCARLRIWDEPMWDYQGQTITVTVSSSEGGSSDVLQSGAEVKKPG
 ASVKVSCKASGYIPTGKYMWVROAPGQGLEWIGDIFPGSGNTHYNEKEFKGKATLTA
 LSSLRSEDATYYCARYDDIYCLDYWGQGSTTVTVSS**SEGTSTGSGAIPVSLRGSGSGGAI**DIVLT
 QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLTYGASSRATGVPARFSGSGSGTDF
 PLTPISSLEPDEATYYCYCLQIYNMPEITPGQGSTKVEIKHHHHHH (SEQ ID NO: 168)

scFv EPCAM 6249 (V₁ CONECTOR scFv (V₂) CONECTOR ESCINDIBLE
 V₁ Inerte Anti-CD3ε) etiqueta de hexahistidina (Sítio de escisión de MMP2 subrayado)

ELVMTQSPSSLTIVTAGEKVTMSCKSSQSILLNSGNQKNYLTVYQQKPGOPPKLIIWASTRESGVPDR
 FTGSGSGSTDEFLTISSVKISCKASGYAFTNYWIKVQRPGHGLEWIGDIFPGSGNTHYNEKEFKGKATLTA
 QSGAELVRFSTSVKISCKASGYAFTNYWIKVQRPGHGLEWIGDIFPGSGNTHYNEKEFKGKATLTA
 DKSSSTAYMQLSSLTFFEDSAVYFCARLRIWDEPMWDYQGQTITVTVSS**SEGGSSDVLQSGAEVKKPG**
 GERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLTYGASSRATGVPARFSGSGSGTDF
 ATYCCQWSNPLTFFGCGTKVEIK**SEGTSTGSGAIPVSLRGSGSGGAI**DVLQSGAEVKKPGASV
 KVSKASGYIPTGKYMWVROAPGQGLEWIGDIFPGSGNTHYNEKEFKGKATLTA
 LRSEDTAVYYCARDELSGYLDYWGQGSTLVTVSSHHHHHH (SEQ ID NO: 169)