(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 012 402**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2016 E 21197244 (3)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024 EP 3988117**

(54) Título: **Anticuerpos terapéuticos y sus usos**

(30) Prioridad:

13.04.2015 US 201562146843 P
13.04.2015 US 201562146504 P
29.02.2016 US 201662301582 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2025

(73) Titular/es:

PFIZER INC. (100.00%)
66 Hudson Boulevard East
New York, NY 10001-2192, US

(72) Inventor/es:

KUO, TRACY CHIA-CHIEN;
CHAPARRO RIGGERS, JAVIER FERNANDO;
CHEN, WEI;
CHEN, AMY SHAW-RU;
PASCUA, EDWARD DERRICK;
VAN BLARCOM, THOMAS JOHN;
BOUSTANY, LEILA MARIE;
HO, WEIHSIEN;
YEUNG, YIK ANDY;
STROP, PAVEL y
RAJPAL, ARVIND

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos terapéuticos y sus usos

Campo

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a CD3 y BCMA. También se proporcionan composiciones que comprenden dichos anticuerpos, procedimientos para producir y purificar tales anticuerpos y su uso en diagnóstico y terapéutica.

Antecedentes

El antígeno de maduración de células B (BCMA, CD269 o TNFRSF17) es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). El BCMA se identificó en un linfoma humano de células T maligno que contenía una translocación t(4;16). El gen se expresa selectivamente en el linaje de las células B, con la máxima expresión en los blastos plasmáticos y las células plasmáticas, células secretoras de anticuerpos. El BCMA se une a dos ligandos, el factor de activación de las células B (BAFF) (también llamado estimulador de los linfocitos B (BLyS) y el ligando expresado por los leucocitos relacionados con el APOL (TALL-1)) y un ligando inductor de la proliferación (APRIL) con una afinidad de 1uM y 16nM, respectivamente. La unión de APRIL o BAFF a BCMA promueve una cascada de señalización en la que participan NF-kappa B, Elk-1, c-Jun N-terminal quinasa y la proteína quinasa activada por mitógenos p38, que producen señales de supervivencia y proliferación celular.

El BCMA también se expresa en las células B malignas y en varios cánceres que implican a los linfocitos B, como el mieloma múltiple, el plasmocitoma, el linfoma de Hodgkin y la leucemia linfocítica crónica. En las enfermedades autoinmunes en las que están implicados los plasmoblastos, como el lupus eritematoso sistémico (SLE) y la artritis reumatoide, las células productoras de anticuerpos que expresan BCMA secretan autoanticuerpos que se atacan a sí mismos.

En el caso del mieloma múltiple, cada año se diagnostican aproximadamente 24,000 nuevos casos en los Estados Unidos, y esta cifra representa aproximadamente el 15% de los cánceres hematológicos diagnosticados recientemente en los Estados Unidos. El mieloma múltiple provoca una media de 11,000 muertes al año, y la tasa media de supervivencia a cinco años es de aproximadamente el 44%, con una supervivencia media de 50-55 meses. El tratamiento actual del mieloma múltiple se centra en la apoptosis de las células plasmáticas y/o en la disminución de la actividad de los osteoclastos (por ejemplo, quimioterapia, talidomida, lenalidomida, bifosfonatos y/o inhibidores del proteasoma como bortezomib (VELCADE®) o carfilzomib). Sin embargo, el mieloma múltiple sigue siendo una enfermedad incurable, y casi todos los pacientes han desarrollado resistencia a estos agentes y acaban recayendo. En consecuencia, un tratamiento alternativo al mieloma múltiple, como el uso de un antagonista anti-BCMA que incluya anticuerpos y otros agentes inmunoterapéuticos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos o conjugados anticuerpo-fármaco), constituiría un agente terapéutico superior.

Los anticuerpos biespecíficos contra BCMA y CD3 se mencionan en EP2762497 y en WO2012/066058.

Sumario

La invención se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable de anticuerpo que se une específicamente a CD3 y un segundo dominio variable de anticuerpo que se une específicamente a BCMA, en el que el primer dominio variable de anticuerpo comprende:

una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 331; (ii) una VH CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 336; y (iii) una VH CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 335; y
una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 343; (ii) una VL CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 341; y (iii) una VL CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 342;
y el segundo dominio variable del anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 156; (ii) una VH CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 158; y (iii) una VH CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 155; y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una VL CDR1 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 209; (ii) una VL CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 221; y (iii) una VL CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 225.

En algunas realizaciones, el primer dominio variable del anticuerpo comprende una región variable (VH) de la cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 334y una región variable (VL) de la cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 323; y el segundo dominio variable del anticuerpo comprende

una región variable (VH) de la cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 112 y una región variable (VL) de la cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 38.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 496. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 497.

En otro aspecto, la invención también proporciona un ácido nucleico que codifica de acuerdo con la reivindicación.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico de la invención, y además proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico o el vector que se reivindica.

La invención también proporciona el anticuerpo biespecífico oara su uso como medicamento en el tratamiento del cáncer.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer relacionado con las células B que se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular, Enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma no Hodgkin de células B (LNH), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC) leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma del tejido linfático asociado a las mucosas, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico primario de células B grandes, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma primario cutáneo difuso de células B grandes (tipo de pierna), linfoma difuso de células B grandes positivo para el VEB de los ancianos, linfoma difuso de células B grandes asociado a la inflamación, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de células B grandes positivo para ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada al HHV8, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico, y otros linfomas relacionados con las células B.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descriptos en el presente documento comprenden una región constante. En algunas realizaciones, los anticuerpos descriptos en el presente documento son de la subclase humana IgG1, IgG2 o IgG2Aa, IgG3, o IgG4. En algunas realizaciones, los anticuerpos descriptos en el presente documento comprenden una región constante glicosilada,.

.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS/DIBUJOS

La Figura 1A - Figura 1D representan los sensorgramas de doble referencia con curvas de ajuste para las interacciones entre los anticuerpos anti-BCMA seleccionados y el BCMA humano.

La Figura 2 muestra los estudios de eficacia *in vivo* de varios ADCs anti-BCMA en el modelo ortotópico de mieloma múltiple MM1S, incluyendo P6E01_VHVL-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; P5A2_VHVL-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; P5C1_VHVL-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; P4G4-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; y P1A11-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101. NNC es un control negativo de anticuerpos no-BCMA. "LCQ05" y "LCQ04" corresponden a la etiqueta transglutaminasa que contiene glutamina SEQ ID NOs: 474 y 475, respectivamente.

La Figura 3 muestra la eficacia *in vivo* de los ADCs anti-BCMA en el modelo ortotópico de mieloma múltiple MM1S, incluyendo L3.Anticuerpo PY/P6E01 conjugado con 1) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-3377, 2) N297Q/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-0101, 3) LCQ05/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-0101, 4) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, y 5) N297Q/K222R/LCQ05-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur01. NNC es un anticuerpo de control no BCMA. "LCQ05" y H7c corresponden a la etiqueta transglutaminasa que contiene glutamina SEQ ID NO: 474 y SEQ ID NO: 454, respectivamente

La Figura 4 también muestra la eficacia *in vivo* de los ADCs anti-BCMA en el modelo de mieloma múltiple ortotópico MM1S, incluyendo L3.Anticuerpo PY/P6E01 conjugado con 1) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-3377, 2) N297Q/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur01, 3) LCQ05/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, 4) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, y 5) N297Q/K222R/LCQ05-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur01. NNC es un anticuerpo de control no-BCMA (anticuerpo-N297Q/K222R-AcLys-VC-PABC-0101). "LCQ05" y H7c

corresponden a la etiqueta transglutaminasa que contiene glutamina SEQ ID NO: 474 y SEQ ID NO: 454, respectivamente.

La Figura 5 también muestra la eficacia *in vivo* de un ADC anti-BCMA en el modelo de mieloma múltiple ortotópico MM1S. El anticuerpo anti-BCMA COMBO_Rd4_0,6nM-C29 ("Combo C29 DI") se conjuga con H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-131 a dosis que van desde 0,1 mg/kg, 0,38 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1,5 mg/kg en comparación con NNC, un anticuerpo de control no-BCMA (anticuerpo-N297Q/K222R-AcLys-VC-PABC-0101) a 3 mg/kg. H7c corresponden a la etiqueta transglutaminasa que contiene glutamina SEQ ID NO: 454.

Las figuras 6A - 6F muestran la eficacia *in vivo* de un anticuerpo biespecífico anti-CD3/anti-CD20 en monos cynomolgus. La depleción de células B tras una dosis única de anticuerpos biespecíficos se muestra como porcentaje de los recuentos previos al estudio.

Las figuras 7A - 7F muestran la eficacia *in vivo* de un anticuerpo biespecífico anti-CD3/anti-CD20 en monos cynomolgus. Se siguió la cinética de las células T CD8+ tras una dosis única de anticuerpos biespecíficos.

Las figuras 8A y 8B muestran la eficacia *in vivo* de un anticuerpo biespecífico anti-CD3/anti-CD20 en monos cynomolgus. Se analizó el efecto del anticuerpo CD3 monovalente sobre la cinética y la proliferación de las células T.

Las figuras 9A - 9D muestran la eficacia *in vivo* de un anticuerpo biespecífico anti-CD3/anti-CD20 en monos cynomolgus. Se analizó el efecto de la afinidad del brazo anti-CD3 en la depleción de células B.

Las figuras 10A y 10B muestran que los anticuerpos anti-CD3 seleccionados tenían una lectura de incorporación de timidina en PBMC humanas y de cynomolgus.

Las figuras 11A - 11D muestran que todos los anticuerpos biespecíficos humanos anti-EpCam_h2B4 tienen actividad de eliminación de células en la configuración in vitro.

La figura 12 muestra que una dosis única de anticuerpo biespecífico humano anti-BCMA/CD3 produjo una regresión tumoral de forma dependiente de la dosis en un modelo de mieloma ortotópico MM1.S.

La Figura 13 muestra que dos dosis de anticuerpo biespecífico humano anti-BCMA/CD3 dieron lugar a una mayor regresión del tumor en un modelo de mieloma Molp8 ortotópico.

La figura 14 muestra que el anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 solo o en combinación con el tratamiento estándar para el mieloma múltiple (lenalidomida o bortezomib) es más eficaz que la lenalidomida y el bortezomib combinados en el modelo tumoral ortotópico Molp8.

La Figura 15A - Figura 15C, respectivamente, muestran que el carfilzomib, la lenalidomida y la doxorrubicina no tienen un efecto negativo sobre la función del anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 en las células OPM2 en comparación con el anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 solo.

La figura 16 muestra los efectos sinérgicos en la función del anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 cuando se combina con carfilzomib y lenalidomida en comparación con cada molécula por separado.

Descripción detallada

La invención aquí divulgada proporciona anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a CD3 y BCMA. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos y los anticuerpos biespecíficos para su uso como medicamento y para su uso en el tratamiento del cáncer.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad del arte. Dichas técnicas se explican ampliamente en la literatura, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984) Methods in Molecular Biology, Humana Press Biología celular: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell y Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press Cell y Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley y Sons Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987) Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994) Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991) Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1999) Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997) Anticuerpos (P. Finch, 1997) Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989) Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a

laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en el presente documento, el término abarca no sólo los anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también los fragmentos de los mismos (como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), los anticuerpos de cadena única (ScFv) y de dominio (incluyendo, por ejemplo, los anticuerpos de tiburón y de camélidos), y las proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, como IgG, IgA o IgM (o subclase de las mismas), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término "fragmento de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno determinado (por ejemplo, BCMA o CD3). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden ser realizadas por fragmentos de un anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen Fab; Fab'; $F(ab')_2$; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), y una región aislada determinante de la complementariedad (CDR).

Un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo o un polipéptido que se "une preferentemente" o "se une específicamente" (utilizados indistintamente en el presente documento) a una diana (por ejemplo, la proteína BCMA o la proteína CD3) es un término bien conocido en la técnica, y los procedimientos para determinar dicha unión específica o preferente también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula presenta una "unión específica" o una "unión preferente" si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia concreta que con otras células o sustancias alternativas. Un anticuerpo se "une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a un epítopo BCMA o a un epítopo CD3 es un anticuerpo que se une a este epítopo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que se une a otros epítopos BCMA, epítopos no BCMA, epítopos CD3 o epítopos no CD3. También se entiende que al leer esta definición, por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítopo) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede o no unirse específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" o "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa la unión preferente.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Como se sabe en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera constan cada una de cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de la secuencia entre especies (es decir, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., 1997, J. Molec. Biol. 273, 525 a 948). Tal y como se utiliza en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquiera de los dos enfoques o por una combinación de ambos.

Una "CDR" de un dominio variable son residuos de aminoácidos dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación de ambas Kabat y Chothia, AbM, contacto, y/o definiciones conformacionales o cualquier procedimiento de determinación de CDR bien conocido en el arte. Las CDR de los anticuerpos pueden identificarse como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat et al. Véase, por ejemplo Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de bucle estructural descritas originalmente por Chothia y otros. Véase, por ejemplo Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. Otros enfoques para la identificación de las CDR incluyen la "definición AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva utilizando el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®), o la "definición de contacto" de las CDR basada en los contactos observados con el antígeno, establecida en MacCallum

et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996. En otro enfoque, denominado aquí "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que hacen contribuciones entálpicas a la unión del antígeno. Véase, por ejemplo Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008. Otras definiciones de los límites de las CDR pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero sin embargo coincidirán con al menos una parte de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de la predicción o de los hallazgos experimentales de que determinados residuos o grupos de residuos o incluso CDR enteras no tienen un impacto significativo en la unión al antígeno. Tal y como se utiliza en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquier enfoque conocido en la técnica, incluyendo combinaciones de enfoques. Los procedimientos utilizados aquí pueden utilizar CDRs definidos según cualquiera de estos enfoques. Para cualquier realización que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto y/o conformacional.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que suelen incluir diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por un procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden hacerse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, Nature 256:495, 1975 o por procedimientos de ADN recombinante como los descritos en U.S. Pat. Nº 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos generadas mediante las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990 por ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el anticuerpo "humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, la rata o el conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (Fv) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas, pero que se incluyen para refinar y optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, de manera óptima, también comprenderá al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Se prefieren los anticuerpos que tienen regiones Fc modificadas como se describe en WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 o CDR H3) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, lo que también se denomina una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

Tal como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos conocidas por los expertos en la materia o divulgadas en el presente documento. Esta definición de anticuerpo humano incluye los anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada o al menos un polipéptido humano de cadena ligera. Un ejemplo de ello es un anticuerpo que comprende polipéptidos murinos de cadena ligera y humanos de cadena pesada. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, en la que dicha biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., Nature Biotechnology, 14:309-314, 1996 Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162, 1998 Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381, 1991 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581, 1991). Los anticuerpos humanos también pueden fabricarse mediante la inmunización de animales en los que se han introducido transgénicamente loci de inmunoglobulina humana en lugar de los loci endógenos, por ejemplo, ratones en los que se han inactivado parcial o totalmente los genes de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en la Pat. de EE.UU. Nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016. Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse inmortalizando linfocitos B humanos que produzcan un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o de la clonación unicelular del ADNc, o pueden haber sido inmunizados *in vitro).* Véase, por ejemplo Cole et al. Monoclonal Antibodies y Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985 Boerner et al., J. Immunol., 147 (1):86-95, 1991y Pat. de EE.UU. Nº 5,750,373.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a los anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, como un anticuerpo en el que las

secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, preferentemente, relativamente cortas (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede estar interrumpida por no aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que ha sido modificada de forma natural o por intervención; por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro, la glicosilación, la lipidación, la acetilación, la fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, como la conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden presentarse como cadenas simples o asociadas.

Un "anticuerpo monovalente" comprende un sitio de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG o Fab). En algunos casos, un anticuerpo monovalente puede tener más de un sitio de unión al antígeno, pero los sitios de unión son de diferentes antígenos.

Un "anticuerpo monoespecífico" comprende dos sitios de unión al antígeno idénticos por molécula (por ejemplo, IgG), de manera que los dos sitios de unión se unen a un epítopo idéntico en el antígeno. Así, compiten entre sí en la unión a una molécula de antígeno. La mayoría de los anticuerpos que se encuentran en la naturaleza son monoespecíficos. En algunos casos, un anticuerpo monoespecífico también puede ser un anticuerpo monovalente (por ejemplo, Fab)

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG). En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos.

Un "biespecífico" o "dual-específico" es un anticuerpo híbrido que tiene dos sitios de unión a antígenos diferentes. Los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo biespecífico se unen a dos epítopos diferentes, que pueden residir en la misma o en diferentes proteínas diana.

Un anticuerpo "bifuncional" es un anticuerpo que tiene sitios de unión al antígeno idénticos (es decir, secuencias de aminoácidos idénticas) en los dos brazos, pero cada sitio de unión puede reconocer dos antígenos diferentes.

Un "heteromultimero", "complejo heteromultimérico" o "polipéptido heteromultimérico" es una molécula que comprende al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un residuo de aminoácido. El heteromultimero puede comprender un "heterodímero" formado por el primer y el segundo polipéptido o puede formar estructuras terciarias de orden superior en las que estén presentes otros polipéptidos además del primer y el segundo polipéptido.

Un "heterodímero", "proteína heterodimérica", "complejo heterodimérico" o "polipéptido heteromultimérico" es una molécula que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un residuo de aminoácido.

La "región bisagra", la "secuencia bisagra" y sus variaciones, tal como se utilizan en el presente documento, incluyen el significado conocido en la técnica, que se ilustra en, por ejemplo, Janeway et al., ImmunoBiology: the immune system in health y disease, (Elsevier Science Ltd., NY) (4ª ed., 1999) Bloom et al., Protein Science (1997), 6:407-415 Humphreys et al., J. Immunol. Methods (1997), 209:193-202.

La "región bisagra similar a la inmunoglobulina", la "secuencia bisagra similar a la inmunoglobulina" y sus variaciones, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a la región bisagra y a la secuencia bisagra de una molécula similar a la inmunoglobulina o al anticuerpo (por ejemplo, inmunoadhesinas). En algunas realizaciones, la región bisagra similar a la inmunoglobulina puede ser de o derivada de cualquier subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o de IgA, IgE, IgD o IgM, incluyendo formas quiméricas de las mismas, por ejemplo, una región bisagra quimérica IgG1/2.

El término "célula efectora inmunitaria" o "célula efectora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula dentro del repertorio natural de células del sistema inmunitario humano que puede activarse para afectar a la viabilidad de una célula objetivo. La viabilidad de una célula objetivo puede incluir la supervivencia celular, la proliferación y/o la capacidad de interactuar con otras células.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de visualización de fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de dichas tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Jayasena, S.D., Clin. *Chem.* 1628-50, 1999 y Fellouse, F.A., et al, J. Mol. Biol., 373(4):924-40, 2007).

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se utilizan indistintamente en este documento, se refieren a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen el ADN y el ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que

pueda ser incorporado a una cadena por la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, como los nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de los nucleótidos puede impartirse antes o después del montaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse aún más después de la polimerización, por ejemplo, mediante la conjugación con un componente de etiquetado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, los "protectores", la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, las modificaciones internucleotídicas como, por ejemplo, las que tienen enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriesteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen elementos colgantes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), los que contienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquiladores, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como las formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilos normalmente presentes en los azúcares puede ser sustituido, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden ser conjugados a soportes sólidos. Los OH terminales 5' y 3' pueden estar fosforilados o sustituidos por aminas o por grupos orgánicos de cobertura de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos como la arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos abásicos de nucleósidos como el ribosido de metilo. Uno o más enlaces fosfodiésteres pueden ser sustituidos por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH_2 ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces de un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en este documento, incluidos el ARN y el ADN.

Como se sabe en la técnica, una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a un material con una pureza de al menos el 50% (es decir, libre de contaminantes), más preferentemente, con una pureza de al menos el 90%, más preferentemente, con una pureza de al menos el 95%, aún más preferentemente, con una pureza de al menos el 98%, y más preferentemente, con una pureza de al menos el 99%.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vector(es) para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula madre original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido(s) de esta invención.

Como se conoce en la técnica, el término "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana suele definirse para que se extienda desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el carboxilo-terminal de la misma. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice UE como en Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos regiones constantes, CH2 y CH3.

Tal como se utiliza en la técnica, "receptor Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es el que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y el FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92, 1991; Capel et al., Immunomethods, 4:25-34, 1994y de Haas et al., J. Lab. J. Clin. Med., 126:330-41, 1995. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol., 117:587, 1976; y Kim et al., J. Immunol., 24:249, 1994).

El término "competir", tal como se utiliza en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o un fragmento (o porción) de unión a antígeno del mismo, se une a un epítopo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de tal manera que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítopo afín disminuye de manera detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo

anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítopo también disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítopo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítopo o ligando afín, ya sea en la misma, mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de sus respectivos epítopos.

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión de C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión del receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos; la fagocitosis; la regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo) y pueden evaluarse mediante diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras del anticuerpo.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, pero que conserva al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. En algunas realizaciones, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La variante de la región Fc poseerá preferentemente al menos un 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original, y más preferentemente, al menos un 90% de identidad de secuencia con la misma, más preferentemente, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% de identidad de secuencia con la misma.

El término "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), la unión del receptor Fc, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la fagocitosis, la unión de C1q y la regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR). Véase, por ejemplo Pat. de EE.UU. nº 6.737.056. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo) y pueden evaluarse mediante diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras del anticuerpo. Un ejemplo de medición de la función efectora es a través de la unión de Fcγ3 y/o C1q.

Tal como se utiliza en el presente documento, la "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan la lisis de la célula diana. La actividad ADCC de una molécula de interés puede evaluarse mediante un ensayo ADCC *in vitro*, como el descrito en la Patente estadounidense nº 5.500.362 o 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células NK. Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal como el divulgado en Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652-656.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de un objetivo en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia con la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se utiliza un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Procedimientos, 202: 163 (1996), puede realizarse.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. A efectos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: reducción de la proliferación de (o destrucción de) células neoplásicas o cancerosas, inhibición de la metástasis de células neoplásicas, remisión de una enfermedad asociada a la BCMA (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), disminución de los síntomas resultantes de una enfermedad asociada a la BCMA (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), aumento de la calidad de vida de quienes padecen una enfermedad asociada a la BCMA (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar una enfermedad asociada a la BCMA (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), retraso de la progresión de una enfermedad asociada al BCMA (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), curación de una enfermedad asociada al BCMA (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), y/o prolongación de la supervivencia de los pacientes que padecen una enfermedad asociada al BCMA (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune).

"Mejorar" significa una disminución o mejora de uno o más síntomas en comparación con la no administración de un anticuerpo BCMA o un conjugado de anticuerpos BCMA. "Mejorar" también incluye acortar o reducir la duración de un síntoma.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "dosis efectiva" o "cantidad efectiva" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar uno o más resultados beneficiosos o deseados. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen la eliminación o la reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso del inicio de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para el uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos como la reducción de la incidencia o la mejora de uno o más síntomas de diversas enfermedades o afecciones asociadas al BCMA (como el mieloma múltiple), la disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, la potenciación del efecto de otro medicamento y/o el retraso de la progresión de la enfermedad asociada al BCMA de los pacientes. Una dosis efectiva puede ser administrada en una o más administraciones. Una dosis efectiva de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr un tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosis efectiva de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse en conjunto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Así, una "dosis eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y puede considerarse que un solo agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes, puede lograrse o se logra un resultado deseable.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferentemente, un humano. Los mamíferos también incluyen, entre otros, a los animales de granja, los animales deportivos, los animales de compañía, los primates, los caballos, los perros, los gatos, los ratones y las ratas.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "vector" significa un constructo capaz de liberar y, preferentemente, expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensadores catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, como las células productoras.

Tal como se utiliza en el presente documento, "secuencia de control de expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de expresión está enlazada de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir.

Tal como se utiliza en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente retenga la actividad biológica y no sea reactivo con el sistema inmunológico del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones como la emulsión aceite/agua, y varios tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la administración en aerosol o parenteral son la solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la solución salina normal (0,9%). Las composiciones que comprenden dichos portadores se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science y Practice of Pharmacy 21st Ed. Editorial Mack, 2005).

El término "etiqueta que contiene glutamina donante de acilo" o "etiqueta de glutamina", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido o una proteína que contiene uno o más residuos de Gln que actúa como aceptor de amina de la transglutaminasa. Véase, por ejemplo WO2012059882 y WO2015015448.

El término "k_{activo}" o "k_a", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo a un antígeno. En concreto, se miden las constantes de velocidad (k_{activo}/k_a y $k_{inactivo}/k_d$) y las constantes de disociación de equilibrio utilizando anticuerpos enteros (es decir, bivalentes) y proteínas BCMA monoméricas.

El término "$k_{inactivo}$" o "k_d", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término "K_D", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción referida a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X" Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

Se entiende que dondequiera que las realizaciones se describan en el presente documento con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan realizaciones análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

Cuando los casos de la divulgación se describen en términos de un grupo de Markush u otra agrupación de alternativas, la presente divulgación abarca no sólo todo el grupo enumerado como un todo, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, pero también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente divulgación también contempla la exclusión explícita de uno o varios de los miembros del grupo.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. A lo largo de esta especificación y de las reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprende", o variaciones como "comprenden" o "que comprende", implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. Salvo que el contexto exija lo contrario, los términos singulares incluirán los plurales y los términos plurales el singular.

Anticuerpos BCMA y procedimientos de fabricación de los mismos

La siguiente divulgación relativa a los anticuerpos BCMA es útil para comprender la invención. Los anticuerpos distintos de un anticuerpo biespecífico que comprende una primer dominio variable del anticuerpo que se une específicamente a CD3 y un segundo dominio variable del anticuerpo que se une específicamente a BCMA y que comprende las secuencias respectivas tal como se definen en las reivindicaciones, no están abarcados el objeto reivindicado pero se consideran útiles para comprender la invención.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo que se une a BCMA (por ejemplo, BCMA humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 353 o número de acceso: Q02223-2) y caracterizado por una o más de las siguientes características: (a) tratar, prevenir, mejorar uno o más síntomas de una condición asociada con células malignas que expresan BCMA en un sujeto (por ejemplo, Cáncer relacionado con las células B, como el mieloma múltiple); (b) inhibir el crecimiento o la progresión del tumor en un sujeto (que tiene un tumor maligno que expresa BCMA); (c) inhibir la metástasis de las células cancerosas (malignas) que expresan BCMA en un sujeto (que tiene una o más células malignas que expresan BCMA); (f) inducir la regresión (por ejemplo, regresión a largo plazo) de un tumor que exprese BCMA; (d) ejercer una actividad citotóxica en las células malignas que expresen BCMA; y (e) bloquear la interacción de BCMA con otros factores aún no identificados.

MLQMAGQCSQ NEYFDSLLHA CIPCQLRCSS NTPPLTCQRY CNASVTNSVK

IGTNAILWTCL GLSLIISLAV FVLMFLLRKI NSEPLKDEFK NTGSGLLGMA

NIDLEKSRTG DEIILPRGLE YTVEECTCED CIKSKPKVDS DHCFPLPAME

EGATILVTTK TNDYCKSLPA ALSATEIEKS ISAR

(SEQ ID NO: 353)

En un caso, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a BCMA, en el que el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 2, 3, 7, 8, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 39, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 83, 87, 92, 95, 97, 99, 101, 104, 106, 110, 112, 114, 118, 120, 122, 112, 125, 127, 313, 314, 363 o 365; y/o una región VL que comprende VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 34, 36, 38, 40, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 317, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 93, 94, 96, 98, 100, 102, 103, 105, 107, 108, 109, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 124, 126, 128, 315, 316 o 364.

En algunos casos, se proporciona un anticuerpo que tiene cualquiera de las secuencias parciales de cadena ligera enumeradas en la Tabla 1 y/o cualquiera de las secuencias parciales de cadena pesada enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
P6E01/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YGSPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
P6E01/ H3.AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YGSPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L1.LG F/L3.KW/P6E 01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC **RASQSLGSFYLA**WYQQKPGQA PRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KH** **YGWPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L1.LG F/L3.NY/P6E 01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSLGSFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L1.GD F/L3.NY/P6E 01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 6)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L1.LG F/L3.K C/H3. AL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSFYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKHYGWPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARARVSPIAALMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)
L1.LG F/L3.K C/H3. AP	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSFYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKHYGWPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAPMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8)
L1.LG F/L3.K C/H3. AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSFYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKHYGWPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAQMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)
L1.LG F/L3.PY/H3.A P	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSFYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAPMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8)
L1.LG F/L3.PY/H3.A Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSFYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAQMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L1.LG F/L3.NY/H3.A L	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSLGSFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAALMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 7)
L1.LG F/L3.NY/H3.A P	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSLGSFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAPMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 8)
L1.LG F/L3.NY/H3.A Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSLGSFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L1.GD F/L3.KC/H3. AL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KHY** **GWPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 11)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAALMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 7)
L1.GD F/L3.KC/H3. AP	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KHY**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
	GWPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 11)	YYCAR**VSPIAAPMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 8)
L1.GD F/L3.K C/H3. AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KHY** **GWPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 11)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L1.GD F/L3.P Y/H3.A Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 12)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L1.GD F/L3.N Y/H3.A L	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 13)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAALMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 7)
L1.GD F/L3.N Y/H3.A P	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 13)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAPMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 8)
L1.GD F/L3.N Y/H3.A Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVGDFYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
	YNYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L3.KW/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KHY GWPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.NY/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH YNYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 17)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ L1.PS/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSSYPS**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ L1.AH/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSAHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
	YPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ L1.FF/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGNT**FYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ L1.PH/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSPHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH YPYPP SFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGNT**FYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ L3.KY/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KYY PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGNT**FYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ L3.KF/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KFY PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGNT**FYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ H2.QR	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADQRKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 24)
L3.PY/ H2.DY	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**DYSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 25)
L3.PY/ H2.YQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SYQGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 26)
L3.PY/ H2.LT	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SLTGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 27)
L3.PY/ H2.HA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFGSY**AMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SHAGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 28)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ H2.QL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADQLKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)
L3.PY/ H3.YA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIYAGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
L3.PY/ H3.AE	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAEMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31)
L3.PY/ H3.AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAQMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ H3.TA Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 32)
L3.PY/ P6E01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 2)
L3.PY/ L1.PS/ H2.QR	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYPS**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADQRKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 24)
L3.PY/ L1.PS/ H2.DY	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYPS**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**DYSGGNT**FYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 25)
L3.PY/ L1.PS/ H2.YQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYPS**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SYQGGNT**FYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 26)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L1.PS/ H2.LT	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYPSWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISLTGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
L3.PY/ L1.PS/ H2.HA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYPSWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISHAGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)
L3.PY/ L1.PS/ H2.QL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYPSWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADQLKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)
L3.PY/ L1.PS/ H3.YA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYPSWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIYAGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
L3.PY/ L1.PS/ H3.AE	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYPSWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAEMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L1.PS/ H3.AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYPS**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L3.PY/ L1.PS/ H3.TA Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYPS**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 32)
L3.PY/ L1.AH/ H2.QR	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSAHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADQRKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 24)
L3.PY/ L1.AH/ H2.DY	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSAHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**DYSGGNT**FYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 25)
L3.PY/ L1.AH/ H2.YQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSAHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SYQGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 26)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L1.AH/ H2.LT	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAHYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISLTGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
L3.PY/ L1.AH/ H2.HA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAHYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISHAGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)
L3.PY/ L1.AH/ H2.QL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAHYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADQLKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)
L3.PY/ L1.AH/ H3.YA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAHYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIYAGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
L3.PY/ L1.AH/ H3.AE	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAHYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIAAEMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L1.AH/ H3.AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSAHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L3.PY/ L1.AH/ H3.TA Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSAHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 32)
L3.PY/ L1.FF/ H2.QR	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADQRKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 24)
L3.PY/ L1.FF/ H2.DY	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**DYSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 25)
L3.PY/ L1.FF/ H2.YQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SYQGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 26)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L1.FF/ H2.LT	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SLTGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 27)
L3.PY/ L1.FF/ H2.HA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SHAGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 28)
L3.PY/ L1.FF/ H2.QL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADQLKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 29)
L3.PY/ L1.FF/ H3.YA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIYAGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 30)
L3.PY/ L1.FF/ H3.AE	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP** **YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAI**SGSGGN**TFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAEMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 31)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L1.FF/ H3.AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L3.PY/ L1.FF/ H3.TA Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSSFFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QHYP YPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 32)
L3.PY/ L1.PH/ H2.QR	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSPHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADQRKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 24)
L3.PY/ L1.PH/ H2.HA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSPHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISHAGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 28)
L3.PY/ L1.PH/ H3.AE	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVSPHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAEMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 31)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L1.PH/ H3.AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSPHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L3.PY/ L1.PH/ H3.TA Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSPHYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QH** **YPYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 32)
L3.PY/ L3.KY/ H2.QR	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KYY** **PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADQRKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 24)
L3.PY/ L3.KY/ H2.DY	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KYY** **PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAIDYSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 25)
L3.PY/ L3.KY/ H2.YQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KYY** **PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISYQGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIASGMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 26)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L3.KY/ H2.LT	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKYYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISLTGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
L3.PY/ L3.KY/ H2.HA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKYYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISHAGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)
L3.PY/ L3.KY/ H2.QL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKYYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADQLKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)
L3.PY/ L3.KY/ H3.YA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKYYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIYAGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
L3.PY/ L3.KY/ H3.TA Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKYYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRVSPIAAQMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 32)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L3.KF/ H2.DY	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKFYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAIDYSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25)
L3.PY/ L3.KF/ H2.YQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKFYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISYQGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)
L3.PY/ L3.KF/ H2.LT	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKFYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISLTGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
L3.PY/ L3.KF/ H2.QL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKFYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADQLKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIASGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)
L3.PY/ L3.KF/ H3.YA	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCKFYPYPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSPIYAGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
L3.PY/ L3.KF/ H3.AE	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KFY** **PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAEMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 31)
L3.PY/ L3.KF/ H3.AQ	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KFY** **PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 3)
L3.PY/ L3.KF/ H3.TA Q	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**KFY** **PYPPSFT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFGSYAMTWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGNTFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCTR**VSPIAAQMDY**WGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 32)
P5A2_ VHVL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAP RLLMY**DASIRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQ** **YGSWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE WVSAISDSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDI**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)
A02_R = 6, nM_C0 = 6	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSVIYLA**WYQQKPGQAPR LLMY**DASIRAT**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQY** **QRWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE WVSAISDSGGSAWYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMSL**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 35)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
A02_R = 6, nM_C0 = 9	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSMWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)
A02_Rd4_6nM_C16	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDIYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQTWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDFGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 39)
A02_Rd4_6nM_C03	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSNLYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQGWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 41)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)
A02_Rd4_6nM_C01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAYYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYERWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 43)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAITASGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 42)
A02_Rd4_6nM_C26	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSLYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQVWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 45)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 44)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
A02_Rd4_6nM_C25	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYLDWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 47)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSRWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMTPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 46)
A02_Rd4_6nM_C22	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQVWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 49)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAVLDSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMTPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 48)
A02_Rd4_6nM_C19	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSVIYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYLAWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 51)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSRWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 50)
A02_R = 6, nM_C0 = 3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFTWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 53)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSKWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52)
A02_Rd4_6nM_C07	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSPyYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYERWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 55)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 54)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
A02_Rd4_6nM_C23	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSVEYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYARWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 57)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSGWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 56)
A02_R = 6, nM_C1 = 8	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEIYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFGWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 59)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAVLDSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 58)
A02_Rd4_6nM_C10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVEMSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAHWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 61)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGSCWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMTPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 60)
A02_Rd4_6nM_C05	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQRWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIFDSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMTPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 62)
A02_R = 6, nM_C1 = 0	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAQYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQRWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 65)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDWGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
A02_Rd4_6nM_C04	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAIYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQVWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 67)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIMSSGGPLYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMALWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66)
A02_R = 6, nM_C2 = 6	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCGPSQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 69)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAILMSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 68)
A02_R = 6, nM_C1 = 3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYWAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYESWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 71)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGYRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 70)
A02_R = 6, nM_C0 = 1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRGGQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 73)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAILSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)
A02_Rd4_6nM_C08	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSFIYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 75)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 74)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
P5C1_ VHVL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSTYLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **TSPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 77)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFS**SY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSTYYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 76)
C01_Rd4_6nM_C24	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSPEYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQ** **YSVWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 79)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFS**SY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSLPYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4_6nM_C26	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSAIYLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **AWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 317)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFS**SY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSLPYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4_6nM_C10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSvYLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **TWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 79)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFS**SY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSLPYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4, nM_C20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSTYLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **RWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 81)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFS**SY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSLPYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
C01_Rd4_6nM_C20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSPIYLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **AFPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 82)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSSY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSLPYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4_6nM_C12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC **WLSQSVSSTYLA**WYQQKPGQA PRLLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**Q** **QYSEWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 84)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSSY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGWSYYADSVKG**RF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 83)
C01_Rd4, nM_C16	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSTYLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **SWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 85)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSSY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSLPYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4, nM_C09	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R** **ASQSVSSIFLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **AWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 86)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSSY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**AIGGSGGSLPYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4_6nM_C09	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**A** **CSQSVSSTYLA**WYQQKPGQAPR LLIY**DASSRAP**GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYS** **AWPLT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 88)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSSY**PMSWVRQAPGKGLE WVS**ATVGSGGSIGYADSVKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR**YWPMDS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 87)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
C01_Rd4-_0,6nM_C0 3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASCDVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYMRSPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 89)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4_0,6, nM_C0 6	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASEAVPSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSAFPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 90)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
C01_Rd4_6nM_C04	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCCSSQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSAFPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 91)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
COMBO_Rd4_0,6n M_C22	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASVRVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYMKWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 93)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSRWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 92)
COMBO_Rd4_6nM_ C21	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAAYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYMCWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 94)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
COMBO_Rd4 _6nM_ C10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYWGWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQCWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 96)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSIHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 95)
COMBO_Rd4 _0,6n M_C04	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 98)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAHIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 97)
COMBO_Rd4 _6nM_ C25	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSpYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 100)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 99)
COMBO_Rd4 _0,6n M_C21	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
COMBO_Rd4 _6nM_ C11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSPIYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYKAWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 102)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 101)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
COMBO_Rd4 _0,6n M_C20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSYLYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYMEWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 103)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
COMBO_Rd4 _6nM_ C09	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAQYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQAWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 105)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIFASGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 104)
COMBO_Rd4 _6nM_ C08	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQKWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 107)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGTWTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 106)
COMBO_Rd4 _0,6n M_C19	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAVYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRAWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 108)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
COMBO_Rd4 _0,6n M_C02	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASIAVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYMVWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 109)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
COMBO_Rd4_0,6n M_C23	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRPRQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQDWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 111)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSALFGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 110)
COMBO_Rd4_0,6n M_C29	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 112)
COMBO_Rd4_0,6n M_C09	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQEWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 113)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 112)
COMBO_Rd4_6nM_ C12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSASYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYMSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 115)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAALGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 114)
COMBO_Rd4_0,6n M_C30	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSYMYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYKSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 116)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 76)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
COMBO_Rd4_0,6n M_C14	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSALYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYGWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 117)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 112)
COMBO_Rd4_6nM_ C07	QGWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 119) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQPISSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMADWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 118)
COMBO_Rd4_6nM_ C02	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYEFWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 121)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISDSGGFVYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 120)
COMBO_Rd4_0,6n M_C05	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYMSWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 123)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 122)
COMBO_Rd4_0,6n M_C17	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISSTYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAYWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 124)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 503)

(continuación)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
COMBO_Rd4_6nM_ C22	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQGWPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 126)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSACLDSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 125)
COMBO_Rd4_0,6n M_C11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSVRYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSWPITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 128)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAALGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 127)
P4G4	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAYGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSPPLFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 80)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLSWSGAFDNWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 363)
P1A11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASYRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSPPSFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 364)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVGTSGAFGIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 365)

En la Tabla 1, las secuencias subrayadas son secuencias CDR según Kabat y en negrita según Chothia, excepto las siguientes secuencias CDR2 de la cadena pesada, en las que las secuencias CDR de Chothia están subrayadas y las secuencias CDR de Kabat están en negrita: P5A2_VHVL, A02_Rd4_0,6nM_C06, A02_Rd4_0,6nM_C09 A02_Rd4_6nM_C16, A02_Rd4_6nM_C03, A02_Rd4_6nM_C01, A02_Rd4_6nM_C26

A02_Rd4_6nM_C25, A02_Rd4_6nM_C22, A02_Rd4_6nM_C19, A02_Rd4_0,6nM_C03 A02_Rd4_6nM_C07, A02_Rd4_6nM_C23, A02_Rd4_0,6nM_C18, A02_Rd4_6nM_C10 A02_Rd4_6nM_C05, A02_Rd4_0,6nM_C10, A02_Rd4_6nM_C04, A02_Rd4_0,6nM_C26

A02_Rd4_0,6nM_C13, A02_Rd4_0,6nM_C01, A02_Rd4_6nM_C08, P5C1_VHVL, C01_Rd4_6nM_C24, C01_Rd4_6nM_C26, C01_Rd4_6nM_C10, C01_Rd4_0,6nM_C27

C01_Rd4_6nM_C20, C01_Rd4_6nM_C12, C01_Rd4_0,6nM_C16, C01_Rd4_0,6nM_C09 C01_Rd4_6nM_C09, C01_Rd4_0,6nM_C03, C01_Rd4_0,6nM_C06, C01_Rd4_6nM_C04

COMBO_Rd4_0,6nM_C22, COMBO_Rd4_6nM_C21, COMBO_Rd4_6nM_C10, COMBO_Rd4_0,6nM_C04, COMBO_Rd4_6nM_C25, COMBO_Rd4_0,6nM_C21, COMBO_Rd4_6nM_C11, COMBO_Rd4_0,6nM_C20, COMBO_Rd4_6nM_C09, COMBO_Rd4_6nM_C08, COMBO_Rd4_0,6nM_C19, COMBO_Rd4_0,6nM_C02, COMBO_Rd4_0,6nM_C23, COMBO_Rd4_0,6nM_C29, COMBO_Rd4_0,6nM_C09, COMBO_Rd4_6nM_C12, COMBO_Rd4_0,6nM_C30, COMBO_Rd4_0,6nM_C14,

COMBO_Rd4_6nM_C07, COMBO_Rd4_6nM_C02, COMBO_Rd4_0,6nM_C05, COMBO_Rd4_0,6nM_C17, COMBO_Rd4_6nM_C22 y COMBO_Rd4_0,6nM_C11.

También se proporcionan porciones de CDR de anticuerpos contra BCMA (incluyendo Chothia, CDR de Kabat y regiones de contacto de CDR). La determinación de las regiones CDR es algo que está dentro de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también denominados "CR combinados" o "CDR ampliadas"). En algunas realizaciones, las CDRs son las CDRs de Kabat. En otras realizaciones, las CDR son las CDR de Chothia. En otras palabras, en las realizaciones con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de las CDR de Kabat, Chothia, combinadas, o combinaciones de las mismas. La Tabla 2 proporciona ejemplos de secuencias CDR proporcionadas en el presente documento,

Tabla 2

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
P6E01 Para los siguientes mAb: P6E01/P6E 01;L1.LGF/ L3.KW/P6E O1; L1.LGF/L3. NY/P6E01; L1.GDF/L3. NY/P6E01; L3.KW/P6E 01; L3.PY/P6E 01; L3.NY/P6E 01; L3.PY/L1.P S/P6E01; L3.PY/L1.A H/P6E01; L3.PY/L1.FF/P6E01; L3.PY/L1.P H/P6E01; L3.PY/L3.K Y/P6E01; L3.PY/L3.K F/P6E01; y L3.PY/P6E 01.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 132) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIASGMDY (SEQ ID NO: 134)
H3.AQ Para los siguientes mAb: P6E01/H3. AQ; L1.LGF/L3. KW/H3.AQ; L1.LGF/L3. PY/H3.AQ; L1.LGF/L3. NY/H3.AQ; L1.GDF/L3. KW/H3.AQ; L1.GDF/L3. PY/H3.AQ; L1.GDF/L3. NY/H3.AQ; L3.PY/H3.A Q; L3.PY/L1.P S/H3.AQ; L3.PY/L1.A H/H3.AQ; L3.PY/L1.F F/H3.AQ; L3.PY/L1.P H/H3.AQ; y L3.PY/L3.KF/H3.AQ.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 132) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIAAQMDY (SEQ ID NO: 135)
H3.AL Para los siguientes mAb: L1. LGF/L3. KW/H3.AL; L1.LGF/L3. NY/H3.AL; y L1.GDF/L3. NY/H3.AL.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 132) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIAALMDY (SEQ ID NO: 136)
H3.AP Para los siguientes mAb: L1.LGF/L3. KW/H3.AP; L1.LGF/L3. PY/H3.AP; L1.LGF/L3 NY/H3.AP; L1.GDF/L3. KW/H3.AP; y L1.GDF/L3 NY/H3.AP.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 132) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIAAPMDY (SEQ ID NO: 137)
H2.QR Para los siguientes mAb: L3.PY/H2. QR; L3.PY/L1.P S/H2.QR; L3.PY/L1.A H/H2.QR; L3.PY/L1.F F/H2.QR; L3.PY/L1.P H/H2.QR; y L3.PY/L3.K Y/H2.QR.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADQRKG (SEQ ID NO: 138) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIASGMDY (SEQ ID NO: 134)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
H2. DY Para los siguientes mAb: L3.PY/H2.D Y; L3.PY/L1.P S/H2.DY; L3.PY/L1.A H/H2.DY; L3.PY/L1.F F/H2.DY; L3.PY/L3.K Y/H2.DY; y L3.PY/L3.K F/H2.DY.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AIDYSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 139) (Kabat) DYSGGN (SEQ ID NO:140) (Chothia)	VSPIASGMDY (SEQ ID NO: 134)
H2.YQ Para los siguientes mAb: L3.PY/H2.Y Q; L3.PY/L1.P S/H2.YQ; L3.PY/L1.A H/H2.YQ; L3.PY/L1.F F/H2.YQ; L3.PY/L3.K Y/H2.YQ; y L3.PY/L3.K F/H2.YQ.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISYQGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 141) (Kabat) SYQGGN (SEQ ID NO:142) (Chothia)	VSPIASGMDY (SEQ ID NO: 134)
H2. LT Para los siguientes mAb: L3.PY/H2.L T; L3.PY/L1.P S/H2.LT; L3.PY/L1.A H/H2.LT; L3.PY/L1.F F/H2.LT; L3.PY/L3.K Y/H2.LT; y L3.PY/L3.K F/H2.LT.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISLTGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 143) (Kabat) SLTGGN (SEQ ID NO:144) (Chothia)	VSPIASGMDY (SEQ ID NO: 134)
H2. HA Para los siguientes mAb: L3.PY/H2.H A; L3.PY/L1.A H/H2.HA; L3.PY/L1.F F/H2.HA; L3.PY/L1.P H/H2.HA; y L3.PY/L3.K Y/H2.HA.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISHAGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 145) (Kabat) SHAGGN (SEQ ID NO:146) (Chothia)	VSPIASGMDY (SEQ ID NO: 134)
H2.QL Para los siguientes mAb: L3.PY/H2. QL; L3.PY/L1.P S/H2.QL; L3.PY/L1.A H/H2.QL; L3.PY/L1.F F/H2.QL; L3.PY/L3.K Y/H2.QL; y L3.PY/L3.K F/H2.QL.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADQLKG (SEQ ID NO: 147) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIASGMDY (SEQ ID NO: 134)
H3.YA Para los siguientes mAb: L3.PY/H3.Y A; L3.PY/L1.P S/H3.YA; L3.PY/L1.A H/H3.YA; L3.PY/L1.F F/H3.YA; L3.PY/L3.K Y/H3.YA; y L3.PY/L3.K F/H3.YA.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 132) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIYAGMDY (SEQ ID NO: 148)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
H3.AE Para los siguientes mAb: L3.PY/H3.A E; L3.PY/L1.A H/H3.AE; L3.PY/L1.F F/H3.AE; L3.PY/L1.P H/H3.AE; y L3.PY/L3.K F/H3.AE.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 132) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIAAEMDY (SEQ ID NO: 149)
H3.TAQ Para los siguientes mAb: L3.PY/H3.T AQ; L3.PY/L1.P S/H3.TAQ; L3.PY/L1.A H/H3.TAQ; L3.PY/L1.F F/H3.TAQ; L3.PY/L1.P H/H3.TAQ; y L3.PY/L3.K F/H3.TAQ.	SYAMT (SEQ ID NO: 129) (Kabat); GFTFGSY (SEQ ID NO: 130) (Chothia); GFTFGSYAMT (SEQ ID NO: 131) (ampliado)	AISGSGGNTFYADSVKG (SEQ ID NO: 132) (Kabat) SGSGGN (SEQ ID NO:133) (Chothia)	VSPIAAQMDY (SEQ ID NO: 135)
P5A2_VH VL y A02_Rd4 _6nM_C0 3	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 153) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMDI (SEQ ID NO: 155)
COMBO_ Rd4_0,6n M_C17; COMBO_ Rd4_0,6n M_C14; y COMBO_ Rd4_0,6n M_C09	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSLPYADSVKG (SEQ ID NO: 504) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDI (SEQ ID NO: 155)
COMBO_ Rd4_0,6n M_C29	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSLPYADIVKG (SEQ ID NO: 158) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDI (SEQ ID NO: 155)
C01_Rd4 _6nM_C0 4; C01_Rd4 _0,6nM_ C03; C01_Rd4 _0,6nM_ C06; COMBO_ Rd4_0,6n M_C02; COMBO_ Rd4_6nM _C21; C01_Rd4 _6nM_C2 6; COMBO_ Rd4_0,6n M_C19; C01_Rd4 _6nM_C2 4; C01_Rd4 _6nM_C2 0; C01_Rd4 _0,6nM_ C09; COMBO_ Rd4_0,6n M_C21; C01_Rd4 _0,6nM_ C04_C27 C01_Rd4 _0,6nM_C16; C01_Rd4 _6nM_C1 0; COMBO_ Rd4_0,6n M_C20	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSLPYADSVKG (SEQ ID NO: 504) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
P5C1_V HVL y COMBO_ Rd4_0,6n M_ C30	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 162) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
A02_Rd4 _0,6nM_ C06	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSAWYADSVKG (SEQ ID NO: 163) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)
A02_Rd4 _0,6nM_ C09	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSAWYADSVKG (SEQ ID NO: 163) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)
A02_Rd4 _0,6nM_C16	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDFGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 165) (Kabat) SDFGGS (SEQ ID NO: 166) (Chothia)	YWPMDI (SEQ ID NO: 155)
A02_Rd4 _6nM_C0 1	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AITASGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 167) (Kabat) TASGGS (SEQ ID NO: 168) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)
A02_Rd4 _6nM_C2 6	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 153) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
A02_Rd4 _6nM_C2 5	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSRWYADSVKG (SEQ ID NO: 169) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMTP (SEQ ID NO: 170)
A02_Rd4 _6nM_C22	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AVLDSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 171) (Kabat) LDSGGS (SEQ ID NO: 172) (Chothia)	YWPMTP (SEQ ID NO: 170)
A02_Rd4 _6nM_C1 9	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSRWYADSVKG (SEQ ID NO: 169) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMSD (SEQ ID NO: 173)
A02_Rd4 _0,6nM_ C03	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSKWYADSVKG (SEQ ID NO: 174) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)
A02_Rd4 _6nM_C0 7	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AIGGSGGSLPYADSVKG (S EQ ID NO: 504) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
A02_Rd4 _6nM_C23	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSGWYADSVKG (SEQ ID NO: 175) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
A02_Rd4 _0,6nM_ C18	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AVLDSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 171) (Kabat) LDSGGS (SEQ ID NO: 172) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)
A02_Rd4 _6nM_C1 0	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSCWYADSVKG (SEQ ID NO: 176) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMTP (SEQ ID NO: 170)
A02_Rd4 _6nM_C0 5	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AIFASGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 177) (Kabat) FASGGS (SEQ ID NO: 178) (Chothia)	YWPMTP (SEQ ID NO: 170)
A02_Rd4 _0,6nM_ C10	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISGWGGSLPYADSVKG (SEQ ID NO: 304) (Kabat) SGWGGS (SEQ ID NO: 179) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
A02_Rd4 _6nM_C0 4	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AIMSSGGPLYYADSVKG (SEQ ID NO: 180) (Kabat) MSSGGP (SEQ ID NO: 181) (Chothia)	YWPMAL (SEQ ID NO: 182)
A02_Rd4 _0,6nM_ C26	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AILMSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 183) (Kabat) LMSGGS (SEQ ID NO: 184) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
A02_Rd4 _0,6nM_ C13	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGYRYYADSVKG (SEQ ID NO: 185) (Kabat) SDSGGY (SEQ ID NO: 186) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)
A02_Rd4 _0,6nM_ C01	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AILSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 187) (Kabat) LSSGGS (SEQ ID NO: 188) (Chothia)	YWPMDI (SEQ ID NO: 155)
A02_Rd4 _6nM_C08	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AILDSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 160) (Kabat) LDSGGS (SEQ ID NO: 172) (Chothia)	YWPMSP (SEQ ID NO: 189)
C01_Rd4 _6nM_C1 2	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGWSYYADSVKG (SEQ ID NO: 190) (Kabat) GGSGGW (SEQ ID NO: 191) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
C01_Rd4 _6nM_C0 9	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	ATVGSGGSIGYADSVKG (SEQ ID NO: 192) (Kabat) VGSGGS (SEQ ID NO: 193) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_0,6n M_C22	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGSRWYADSVKG (SEQ ID NO: 169) (Kabat) SDSGGS (SEQ ID NO: 154) (Chothia)	YWPMDI (SEQ ID NO: 155)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
COMBO_ Rd4_0,6n M_C10	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSIHYADSVKG (SEQ ID NO: 194) (Kabat) GGSGGS(SEQIDNO:159) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_0,6n M_C04	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AHIGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 195) (Kabat) IGSGGS (SEQ ID NO: 196) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_0,6n M_C25	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 162) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDP (SEQ ID NO: 197)
COMBO_ Rd4_6nM _C21	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSLPYADSVKG (SEQ ID NO: 504) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_6nM _C11	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSLGYADSVKG (SEQ ID NO: 198) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_6nM _C09	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIFASGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 177) (Kabat) FASGGS (SEQ ID NO: 178) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
COMBO_ Rd4_6nM _C08	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGTWTYYADSVKG (SEQ ID NO: 199) (Kabat) GGSGTW (SEQ ID NO: 200) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_0,6n M_C23	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	ALFGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 201) (Kabat) FGSGGS (SEQ ID NO: 202) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_0,6n M_C12	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AALGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 203) (Kabat) LGSGGS (SEQ ID NO: 204) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_6nM_C07	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AIGGSGGSLPYADSVKG (SEQ ID NO: 504) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMAD (SEQ ID NO: 205)
COMBO_ Rd4_6nM _C02	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AISDSGGFVYYADSVKG (SEQ ID NO: 206) (Kabat) SDSGGF (SEQ ID NO: 207) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_6nM _C05	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	AIGGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 162) (Kabat) GGSGGS (SEQ ID NO: 159) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
COMBO_ Rd4_6nM _C22	SYAMN (SEQ ID NO: 150) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 152) (ampliado)	ACLDSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO: 208) (Kabat) LDSGGS(SEQIDNO: 172) (Chothia)	YWPMDS (SEQ ID NO: 161)
COMBO_ Rd4_6nM _C11	SYPMS (SEQ ID NO: 156) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYPMS (SEQ ID NO: 157) (ampliado)	AALGSGGSTYYADS VKG (SEQ ID NO: 203) (Kabat) LGSGGS (SEQ ID NO: 204) (Chothia)	YWPMSL (SEQ ID NO: 164)
P4G4	SYAMS (SEQ ID NO: 366) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 151) (Chothia); GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 367) (ampliado)	SASGGS (SEQ ID NO: 368) (Chothia) AI SASGGSTYYADSVK G (SEQ ID NO: 369) (Kabat)	LSWSGAFDN (SEQ ID NO: 370)
P1A11	SYAMS (SEQ ID NO: 366) (Kabat); GFTFRSY (SEQ ID NO: 371) GFTFRSYAMS (SEQ ID NO: 372)	SGSGGS (SEQ ID NO: 359) (Chothia) AISGSGGSTFYADS VKG (SEQ ID NO: 360) (Kabat)	VGTSGAFGI (SEQ ID NO: 361)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
P6E01 Para los siguientes mAb: P6E01 /P6 E01; y P6E01/H3. AQ.	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYGSPPSFT (SEQ ID NO: 211)
L1.LGF/ L3.KW Para los siguientes mAb: L1.LGF/L3 .KW/P6E0 1; L1.LGF/L3 .KW/H3.A L; L1.LGF/L3 .KW/H3.A P; y L1.LGF/L3 .KW/H3.A Q	RASQSLGSFYLA (SEQ ID NO: 212)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	KHYGWPPSFT (SEQ ID NO: 213)
L1.LGF/ L3. NY Para los siguientes mAb: L1.LGF/L3 .NY/P6E0 1; L1.LGF/L3 .NY/H3.AL; L1.LGF/L3 .NY/H3.AP; y L1.LGF/L3 .NY/H3AQ	RASQSLGSFYLA (SEQ ID NO: 212)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYNYPPSFT (SEQ ID NO: 214)
L1.GDF/ L3. NY Para los siguientes mAb: L1.GDF/L 3.NY/P6E 01; L1.GDF/L 3.NY/H3.A L; L1.GDF/L 3.NY/H3.A P; y L1.GDF/L 3.NY/H3.A Q	RASQSVGDFYLA (SEQ ID NO: 215)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYNYPPSFT (SEQ ID NO: 214)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
L1.LGF/ L3. PY Para los siguientes mAb: L1.LGF/L3 .PY/H3.AP; y L1.LGF/L3 .PY/H3.A Q	RASQSLGSFYLA (SEQ ID NO: 212)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYPYPPSFT (SEQ ID NO: 216)
L1.GDF /L3.KW Para los siguientes mAb: L1.GDF /L3.KW/H3 .AL; L1.GDF /L3.KW/H3 .AP; y L1.GDF /L3.KW/H3 .AQ	RASQSVGDFYLA (SEQ ID NO: 215)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	KHYGWPPSFT (SEQ ID NO: 213)
L1.GDF /L3.PY/H 3.AQ	RASQSVGDFYLA (SEQ ID NO: 215)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYPYPPSFT (SEQ ID NO: 216)
L3. KW/P 6E01	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	KHYGWPPSFT (SEQ ID NO: 213)
L3. PY Para los siguientes mAb: L3.PY/P6 E01; L3.PY/H2. QR; L3.PY/H2. DY; L3.PY/H2. YQ; L3.PY/H2. LT; L3.PY/H2. HA; L3.PY/H2. QL; L3.PY/H3. YA; L3.PY/H3. AE; L3.PY/H3. AQ; L3.PY/H3. TAQ	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYPYPPSFT (SEQ ID NO: 216)
L3. NY/P 6E01	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYNYPPSFT (SEQ ID NO: 214)
L3.PY/L 1.PS Para los siguientes mAb: L3.PY/L1. PS /P6E01; L3.PY/L1. PS/H2.QR; L3.PY/L1. PS/H2.DY; L3.PY/L1. PS/H2.YQ L3.PY/L1. PS/H2.LT; L3.PY/L1. PS/H2.HA; L3.PY/L1. PS/H2.QL; L3.PY/L1. PS/H3.YA; L3.PY/L1. PS/H3.AE; L3.PY/L1. PS/H3.AQ L3.PY/L1. PS/H3.TA Q	RASQSVSSSYPS (SEQ ID NO: 217)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYPYPPSFT (SEQ ID NO: 216)
L3.PY/L 1.AH Para los siguientes mAb: L3.PY/L1. AH/P6E01; L3.PY/L1. AH/H2.QR; L3.PY/L1. AH/H2.DY; L3.PY/L1. AH/H2.YQ; L3.PY/L1. AH/H2.LT; L3.PY/L1. AH/H2.HA L3.PY/L1. AH/H2.QL; L3.PY/L1. AH/H3.YA; L3.PY/L1. AH/H3.AE; L3.PY/L1. AH/H3.AQ; L3.PY/L1. AH/H3.TA Q	RASQSVSAHYLA (SEQ ID NO: 218)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYPYPPSFT (SEQ ID NO: 216)
L3.PY/L 1.FF Para los siguientes mAb: L3.PY/L1. FF/P6E01; L3.PY/L1. FF/H2.QR; L3.PY/L1. FF/H2.DY; L3.PY/L1. FF/H2.YQ; L3.PY/L1. FF/H2.LT; L3.PY/L1. FF/H2.HA; L3.PY/L1. FF/H2.QL; L3.PY/L1. FF/H3.YA; L3.PY/L1. FF/H3.AE; L3.PY/L1. FF/H3.AQ; y L3.PY/L1. FF/H3.TA Q	RASQSVSSFFLA (SEQ ID NO: 219)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYPYPPSFT (SEQ ID NO: 216)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
L3.PY/L 1.PH Para los siguientes mAb: L3.PY/L1. PH/P6E01; L3.PY/L1. PH/H2.QR; L3.PY/L1. PH/H2.HA; L3.PY/L1. PH/H3.AE; L3.PY/L1. PH/H3.AQ; y L3.PY/L1. PH/H3.TA Q	RASQSVSPHYLA (SEQ ID NO: 219)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	QHYPYPPSFT (SEQ ID NO: 216)
L3.PY/L3.KY Para los siguientes mAb: L3.PY/L3. KY/P6E01; L3.PY/L3. KY/H2.QR; L3.PY/L3. KY/H2.DY; L3.PY/L3. KY/H2.Y Q; L3.PY/L3. KY/H2.LT; L3. PY/L3. KY/H2. H A; L3.PY/L3. KY/H2.QL; L3. PY/L3. KY/H3.Y A; y L3.PY/L3. KY/H3.T AQ	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	KYYPYPPSFT (SEQ ID NO: 220)
L3. PY/L 3. KF Para los siguientes mAb: L3.PY/L3. KF/H2.DY; L3.PY/L3. KF/H2.YQ; L3.PY/L3. KF/H2.LT; L3.PY/L3. KF/H2.QL; L3.PY/L3. KF/H3.YA; L3.PY/L3. KF/H3.AE; L3.PY/L3. KF/H3.AQ; y L3.PY/L3. KF/H3.TA Q	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	GASSRAT (SEQ ID NO: 210)	KFYPYPPSFT (SEQ ID NO: 220)
P5A2_V HVL	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYGSWPLT (SEQ ID NO: 222)
A02_Rd 4_0,6nM _C06	RASQSVSVIYLA (SEQ ID NO: 223)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQRWPLT (SEQ ID NO: 224)
A02_Rd 4_0,6nM _C09; COMBO _Rd_ 0,6 nM_C29; y COMBO _Rd4_0,6nM_ C2 1	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQSWPLT (SEQ ID NO: 225)
A02_Rd 4_6nM_ C16	RASQSVSDIYLA (SEQ ID NO: 226)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQTWPLT (SEQ ID NO: 227)
A02_Rd 4_6nM_ C03	RASQSVSNIYLA (SEQ ID NO: 228)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQGWPLT (SEQ ID NO: 229)
A02_Rd 4_6nM_ C01	RASQSVSAYYLA (SEQ ID NO: 230)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYERWPLT (SEQ ID NO: 231)
A02_Rd 4_6nM_ C26	RASQSVSSIYLA (SEQ ID NO: 232)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQVWPLT (SEQ ID NO: 233)
A02_Rd 4_6nM_ C25	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYLDWPLT (SEQ ID NO: 234)
A02_Rd 4_6nM_ C22	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQVWPLT (SEQ ID NO: 233)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
A02_Rd 4_6nM_ C19	RASQSVSVIYLA (SEQ ID NO: 223)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYLAWPLT (SEQ ID NO: 236)
A02_Rd 4_0,6nM _C03	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYFTWPLT (SEQ ID NO: 237)
A02_Rd 4_6nM_ C07	RASQSVSPYYLA (SEQ ID NO: 238)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYERWPLT (SEQ ID NO: 231)
A02_Rd 4_6nM_ C23	RASQSVSVEYLA (SEQ ID NO: 239)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYARWPLT (SEQ ID NO: 240)
A02_Rd 4_0,6nM _C18	RASQSVSEIYLA (SEQ ID NO: 241)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYFGWPLT (SEQ ID NO: 242)
A02_Rd 4_6nM_ C10	RASQSVEMSYLA (SEQ ID NO: 243)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYAHWPLT (SEQ ID NO: 244)
A02_Rd 4_6nM_ C05	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQRWPLT (SEQ ID NO: 224)
A02_Rd 4_0,6nM _C10	RASQSVSAQYLA (SEQ ID NO: 245)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQRWPLT (SEQ ID NO: 224)
A02_Rd 4_6nM_ C04	RASQSVSAIYLA (SEQ ID NO: 235)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQVWPLT (SEQ ID NO: 233)
A02_Rd 4_0,6nM _C26	GPSQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 246)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQSWPLT (SEQ ID NO: 225)
A02_Rd 4_0,6nM _C13	RASQSVSSSYWA (SEQ ID NO: 247)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYESWPLT (SEQ ID NO: 248)
A02_Rd 4_0,6nM _C01	RGGQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 249)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQSWPLT (SEQ ID NO: 225)
A02_Rd 4_6nM_ C08	RASQSVSFIYLA (SEQ ID NO: 250)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYGSWPLT (SEQ ID NO: 222)
P5C1_V HVL	RASQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 251)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSTSPLT (SEQ ID NO: 253)
C01_Rd 4_6nM_ C24	RASQSVSPEYLA (SEQ ID NO: 254)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSVWPLT (SEQ ID NO: 255)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
C01_Rd 4_6nM_ C26	RASQSVSAIYLA (SEQ ID NO: 235)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSAWPLT (SEQ ID NO: 256)
C01_Rd 4_6nM_ C10	RASQSVSSVYLA (SEQ ID NO: 257)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSTWPLT (SEQ ID NO: 258)
C01_Rd 4_0,6nM _C27	RASQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 251)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSRWPLT (SEQ ID NO: 259)
C01_Rd 4_6nM_ C20	RASQSVSPIYLA (SEQ ID NO: 260)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSAFPLT (SEQ ID NO: 261)
C01_Rd 4_6nM_ C12	WLSQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 262)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSEWPLT (SEQ ID NO: 263)
C01_Rd 4_0,6nM _C16	RASQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 251)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSSWPLT (SEQ ID NO: 264)
C01_Rd 4_0,6nM _C09	RASQSVSSIFLA (SEQ ID NO: 265)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSAWPLT (SEQ ID NO: 256)
C01_Rd 4_6nM_ C09	ACSQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 266)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSAWPLT (SEQ ID NO: 256)
C01_Rd 4_0,6nM _C03	RASCDVSSTYLA (SEQ ID NO: 267)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYMRSPLT (SEQ ID NO: 268)
C01_Rd 4_0,6nM _C06	RASEAVPSTYLA (SEQ ID NO: 269)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSAFPLT (SEQ ID NO: 261)
C01_Rd 4_0,6nM_C04	CSSQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 270)	DASSRAP (SEQ ID NO: 252)	QQYSAFPLT (SEQ ID NO: 261)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C2 2	RASVRVSSTYLA (SEQ ID NO: 271)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYMKWPLT (SEQ ID NO: 272)
COMBO _Rd4_6 nM_C21	RASQSVSAAYLA (SEQ ID NO: 273)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYMCWPLT (SEQ ID NO: 274)
COMBO _Rd4_6 nM_C10	RASQSVSSSYWG (SEQ ID NO: 275)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQCWPLT (SEQ ID NO: 276)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C0 4	RASQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 251)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQSWPLT (SEQ ID NO: 225)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
COMBO _Rd4_6 nM_C25	RASQSVSSPYLA (SEQ ID NO: 277)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQSWPLT (SEQ ID NO: 225)
COMBO _Rd4_6 nM_C11	RASQSVSPIYLA (SEQ ID NO: 260)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYKAWPLT (SEQ ID NO: 278)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C2 0	RASQSVSYLYLA (SEQ ID NO: 279)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYMEWPLT (SEQ ID NO: 280)
COMBO _Rd4_6 nM_C09	RASQSVSAQYLA (SEQ ID NO: 245)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQAWPLT (SEQ ID NO: 281)
COMBO _Rd4_6 nM_C08	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQKWPLT (SEQ ID NO: 282)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C1 9	RASQSVSAVYLA (SEQ ID NO: 283)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYRAWPLT (SEQ ID NO: 284)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C0 2	RASIAVSSTYLA (SEQ ID NO: 285)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYMVWPLT (SEQ ID NO: 286)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C2 3	RPRQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 287)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQDWPLT (SEQ ID NO: 288)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C0 9	RASQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 251)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQEWPLT (SEQ ID NO: 289)
COMBO _Rd4_6 nM_C12	RASQSVSASYLA (SEQ ID NO: 290)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYMSWPLT (SEQ ID NO: 291)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C3 0	RASQSVSYMYLA (SEQ ID NO: 292)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYKSWPLT (SEQ ID NO: 293)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C1 4	RASQSVSAIYLA (SEQ ID NO: 235)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYYGWPLT (SEQ ID NO: 294)
COMBO _Rd4_6 nM_C07	RASQPISSSYLA (SEQ ID NO: 295)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQGWPLT (SEQ ID NO: 229)
COMBO _Rd4_6 nM_C02	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYEFWPLT (SEQ ID NO: 296)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C0 5	RASQSVSSTYLA (SEQ ID NO: 251)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYMSWPLT (SEQ ID NO: 291)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
COMBO _Rd4_0. 6nM_C1 7	RASQGISSTYLA (SEQ ID NO: 297)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYAYWPLT (SEQ ID NO: 298)
COMBO _Rd4_6 nM_C22	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYQGWPLT (SEQ ID NO: 229)
COMBO _Rd4_0. 6nM_C1 1	RASQSVSVRYLA (SEQ ID NO: 299)	DASIRAT (SEQ ID NO: 221)	QQYGSWPIT (SEQ ID NO: 300)
P4G4	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 209)	GASSRAY (SEQ ID NO: 362)	QHYGSPPLFT (SEQ ID NO: 499)
P1A11	RASQNVSSSYLA (SEQ ID NO: 500)	GASYRAT (SEQ ID NO: 501)	QHYGSPPSFT (SEQ ID NO: 211)

En algunos casos, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, que se une específicamente a BCMA, donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 112; y/o una región VL que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 38. En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLMYDASIRATG
IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYQSWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 357) y una cadena pesada que comprende

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGG
SLPYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMDIWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 358).

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, que se une específicamente a BCMA, donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2, 32, 42 o 78; y/o una región VL que comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 6, 525 a 85).

En algunas realizaciones, la divulgación también proporciona porciones de CDR de anticuerpos a anticuerpos BCMA basados en regiones de contacto de CDR. Las regiones de contacto CDR son regiones de un anticuerpo que imprimen especificidad al anticuerpo para un antígeno. En general, las regiones de contacto de las CDR incluyen las posiciones de los residuos en las CDR y las zonas de Vernier, que están restringidas para mantener la estructura de bucle adecuada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. Véase, por ejemplo Makabe et al., J. Biol. Chem, 283:1156-1166, 2007. La determinación de las regiones de contacto de las CDRs está bien dentro de la habilidad del arte.

La afinidad de unión (K_D) del anticuerpo BCMA como se describe en el presente documento a BCMA (como BCMA humano (por ejemplo, (SEQ ID NO: 353) puede ser de aproximadamente 0,002 nM a aproximadamente 6500 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente cualquiera de 6500 nm, 6000 nm, 5986 nm, 5567 nm, 5500 nm, 4500 nm, 4000 nm, 3500 nm, 3000 nm, 2500 nm, 2134 nm, 2000 nm, 1500 nm, 1000 nm, 750 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nM, 193 nM, 100 nM, 90 nM, 50 nM, 45 nM, 40 nM, 35 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 19 nm, 18 nm, 17 nm, 16 nm, 15 nM, 10 nM, 8 nM, 75 nM, 7 nM, 6,5 nM, 6 nM, 5,5 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,01 nM o 0,002 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor que cualquiera de 6500 nm, 6000 nm, 5500 nm, 5000 nm, 4000 nm, 3000 nm, 2000 nm, 1000 nm, 900 nm, 800 nm, 250 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 7,5 nM, 7 nM, 6,5 nM, 6 nM, 5 nM, 4,5 nM, 4 nM, 3,5 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1 nM, o 0,5 nM.

En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos descritos en el presente documento o hechos por los procedimientos y que tienen las características descritas en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a BCMA, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, como excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo tampones, que son bien conocidos en la técnica.

También se proporcionan procedimientos para hacer cualquiera de estos anticuerpos por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, por procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos simples o de fusión) como se ha descrito anteriormente o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se fabrican convenientemente por síntesis química. Los procedimientos de síntesis química son conocidos en el arte y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un anticuerpo podría ser producido por un sintetizador automatizado de polipéptidos que emplee el procedimiento de fase sólida. Véase también, Pat. de EE.UU. Nº 5.807.715 , 4.816.567, y 6.331.415.

En un caso, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica la cadena pesada y/o las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo P6E01/P6E01, P6E01/P6E01, P6E01/H3.AQ, L1.LGF/L3.KW/P6E01; L1.LGF/L3.NY/P6E01, L1.GDF/L3.NY/P6E01, L1.LGF/L3.KW/H3.AL, L 1.LGF/L3.KW/H3.AP, L 1.LGF/L3.KW/H3.AQ, L1.LGF/L3.PY/H3.AP, L 1.LGF/L3.PY/H3.AQ, L 1.LGF/L3.NY/H3.AL, L1.LGF/L3.NY/H3.AP, L 1.LGF/L3.NY/H3.AQ, L1.GDF/L3.KW/H3.AL, L1.GDF/L3.KW/H3.AP, L1.GDF/L3.KW/H3.AQ, L1.GDF/L3.PY/H3.AQ, L1.GDF/L3.NY/H3.AL, L1.GDF/L3.NY/H3.AP, L1.GDF/L3.NY/H3.AQ, L3.KW/P6E01, L3.PY/P6E01, L3.NY/P6E01, L3.PY/L1.PS/P6E01, L3.PY/L1.AH/P6E01, L3.PY/L1.FF/P6E01, L3.PY/L1.PH/P6E01, L3.PY/L3.KY/P6E01, L3.PY/L3.KF/P6E01, L3.PY/H2.QR, L3.PY/H2.DY, L3.PY/H2.YQ, L3.PY/H2.LT, L3.PY/H2.HA, L3.PY/H2.QL, L3.PY/H3.YA, L3.PY/H3.AE, L3.PY/H3.AQ, L3.PY/H3.TAQ, L3.PY/P6E01, L3.PY/L1.PS/H2.QR, L3.PY/L1.PS/H2.DY, L3.PY/L1.PS/H2.YQ, L3.PY/L1.PS/H2.LT, L3.PY/L1.PS/H2.HA, L3.PY/L1.PS/H2.QL, L3.PY/L1.PS/H3.YA, L3.PY/L1.PS/H3.AE, L3.PY/L1.PS/H3.AQ, L3.PY/L1.PS/H3.TAQ, L3.PY/L1.AH/H2.QR, L3.PY/L1.AH/H2.DY, L3.PY/L1.AH/H2.YQ, L3. PY/L 1.AH/H2. L T, L3.PY/L1.AH/H2.HA, L3.PY/L 1.AH/H2.QL, L3.PY/L 1.AH/H3.YA, L3.PY/L 1.AH/H3.AE, L3.PY/L1.AH/H3.AQ, L3.PY/L 1.AH/H3.TAQ, L3.PY/L 1.FF/H2.QR, L3.PY/L1.FF/H2.DY, L3.PY/L1.FF/H2.YQ, L3.PY/L1.FF/H2.LT, L3.PY/L1.FF/H2.HA, L3.PY/L1.FF/H2.QL, L3.PY/L1.FF/H3.YA, L3.PY/L 1.FF/H3.AE, L3.PY/L 1.FF/H3.AQ, L3.PY/L 1.FF/H3.TAQ, L3.PY/L1.PH/H2.QR, L3.PY/L 1.PH/H2.HA, L3.PY/L 1.PH/H3.AE, L3.PY/L 1.PH/H3.AQ, L3.PY/L1.PH/H3.TAQ, L3.PY/L3.KY/H2.QR, L3.PY/L3.KY/H2.DY, L3.PY/L3.KY/H2.YQ L3.PY/L3.KY/H2.LT, L3.PY/L3.KY/H2.HA, L3.PY/L3.KY/H2.QL, L3.PY/L3.KY/H3.YA L3.PY/L3.KY/H3.TAQ, L3.PY/L3.KF/H2.DY, L3.PY/L3.KF/H2.YQ, L3.PY/L3.KF/H2.LT L3.PY/L3.KF/H2.QL, L3.PY/L3.KF/H3.YA, L3.PY/L3.KF/H3.AE, L3.PY/L3.KF/H3.AQ L3.PY/L3.KF/H3.TAQ, P5A2_VHVL, A02_Rd4_0,6nM_C06, A02_Rd4_0,6nM_C09. A02_Rd4_6nM_C16, A02_Rd4_6nM_C03, A02_Rd4_6nM_C01, A02_Rd4_6nM_C26 A02_Rd4_6nM_C25, A02_Rd4_6nM_C22, A02_Rd4_6nM_C19, A02_Rd4_0,6nM_C03 A02_Rd4_6nM_C07, A02_Rd4_6nM_C23, A02_Rd4_0,6nM_C18, A02_Rd4_6nM_C10 A02_Rd4_6nM_C05, A02_Rd4_0,6nM_C10, A02_Rd4_6nM_C04, A02_Rd4_0,6nM_C26 A02_Rd4_0,6nM_C13, A02_Rd4_0,6nM_C01, A02_Rd4_6nM_C08, P5C1_VHVL,C01_Rd4_6nM_C24, C01_Rd4_6nM_C26, C01_Rd4_6nM_C10, C01_Rd4_0,6nM_C27 C01_Rd4_6nM_C20, C01_Rd4_6nM_C12, C01_Rd4_0,6nM_C16, C01_Rd4_0,6nM_C09 C01_Rd4_6nM_C09, C01_Rd4_0,6nM_C03, C01_Rd4_0,6nM_C06, C01_Rd4_6nM_C04 COMBO_Rd4_0,6nM_C22, COMBO_Rd4_6nM_C21, COMBO_Rd4_6nM_C10, COMBO_Rd4_0,6nM_C04, COMBO_Rd4_6nM_C25, COMBO_Rd4_0,6nM_C21, COMBO_Rd4_6nM_C11, COMBO_Rd4_0,6nM_C20, COMBO_Rd4_6nM_C09, COMBO_Rd4_6nM_C08, COMBO_Rd4_0,6nM_C19, COMBO_Rd4_0,6nM_C02, COMBO_Rd4_0,6nM_C23, COMBO_Rd4_0,6nM_C29, COMBO_Rd4_0,6nM_C09, COMBO_Rd4_6nM_C12, COMBO_Rd4_0,6nM_C30, COMBO_Rd4_0,6nM_C14, COMBO_Rd4_6nM_C07, COMBO_Rd4_6nM_C02, COMBO_Rd4_0,6nM_C05, COMBO_Rd4_0,6nM_C17, COMBO_Rd4_6nM_C22, COMBO_Rd4_0,6nM_C11, COMBO_Rd4_0,6nM_C29, P4G4, o P1A11. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede entonces expandirse y congelarse para su uso futuro. En el presente documento se describen con más detalle los vectores (incluidos los vectores de expresión) y las células huésped.

La divulgación también proporciona scFv de anticuerpos de esta divulgación. Los fragmentos de la región variable de cadena única se fabrican uniendo las regiones variables de cadena ligera y/o pesada mediante un péptido de enlace corto (Bird et al., Science 242:423-426, 1988). Un ejemplo de péptido de enlace es $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 498), que

hace de puente entre la terminación carboxi de una región variable y la terminación amino de la otra región variable, aproximadamente 3,5 nm. Se han diseñado y utilizado enlazadores de otras secuencias (Bird et al., 1988, supra). Los enlazadores deben ser polipéptidos cortos y flexibles y, preferentemente, estar compuestos por menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. Los enlazadores pueden, a su vez, modificarse para realizar funciones adicionales, como la fijación de fármacos o la sujeción a soportes sólidos. Las variantes de cadena única pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, se puede utilizar un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, se puede introducir un plásmido adecuado que contenga el polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariótica, como la levadura, la planta, el insecto o las células de mamífero, o procariótica, como E. coli. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden hacerse mediante manipulaciones rutinarias como la ligadura de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena única, como los diacuerpos o los minicuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los que los dominios variable de la cadena pesada (VH) y variable de la cadena ligera (VL) se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 90:6444-6448, 1993 Poljak, R. J., et al., Structure 2:1121-1123, 1994). El minicuerpo incluye los dominios VL y VH de un anticuerpo nativo fusionados con la región bisagra y el dominio CH3 de la molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo US5.837.821.

En otro caso, se proporcionan composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. En algunos casos, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En otros caso, la composición comprende uno o ambos polinucleótidos mostrados en la SEQ ID NO: 486 y SEQ ID NO: 485 abajo:

COMBO_Rd4_0,6nM_C29 región variable de la cadena pesada

GAAGTCCAACTCCTCGAATCCGGTGGCGGCCTTGTCCAGCCTGGAGGTTCCTTGC
GCCTGTCATGTGCCGCCAGCGGATTCACCTTCTCGTCCTACCCGATGTCGTGGGT
CCGCCAGGCTCCGGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCAGCCATCGGAGGATCGG
GGGGCTCCCTGCCCTACGCCGATATCGTGAAGGGAAGGTTCACCATTAGCCGGG
ACAACTCCAAGAACACTCTGTACCTCCAAATGAACAGCCTGAGAGCGGAGGACAC
CGCAGTGTACTATTGCGCCCGGTACTGGCCAATGGACATCTGGGGCCAGGGGAC
TCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 486)

COMBO_Rd4_0,6nM_C29 región variable de la cadena ligera

GAGATCGTGCTGACTCAGTCCCCTGGAACCCTGTCCCTGTCACCTGGCGAAAGAG
CTACCTTGTCCTGTCGCGCATCACAATCCGTGTCGTCGAGCTATCTCGCGTGGTA
CCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCCAAGGCTGCTTATGTACGACGCCTCCATCCG
GGCCACTGGTATCCCCGACCGCTTCTCGGGCTCCGGAAGCGGCACCGACTTCAC
CCTGACTATTTCCCGGCTCGAACCGGAGGATTTCGCCGTGTACTACTGCCAACAG
TACCAGAGCTGGCCGCTGACGTTTGGGCAGGGGACCAAGGTCGAAATCAAA
(SEQ ID NO: 485)

En otros casos, la composición comprende uno o ambos polinucleótidos mostrados en la SEQ ID NO: 488 y SEQ ID NO: 487 abajo:

Región variable de la cadena pesada L3.PY/H3TAQ

GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTG
AGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCGGCAGCTACGCTATGACCTGGG
TGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCG

GCGGCAATACCTTCTACGCCGAGAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGG
ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACA
CCGCCGTGTACTATTGTACACGGGTGTCCCCTATCGCCGCGCAGATGGATTATTG
GGGCCAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 488)

Región variable de la cadena pesada L3.PY/H3TAQ

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACCCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAAAGA
GCCACCCTGTCCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGTCCAGCAGCTACCTGGCCTGG
TATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCCCGGCTGCTGATCTATGGCGCCTCTTCTA
GAGCCACCGGCATCCCCGATAGATTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCA
CCCTGACCATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCA
CTACCCTTATCCCCCCAGCTTCACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO: 487)

En otras realizaciones, la composición comprende uno o ambos polinucleótidos mostrados en la SEQ ID NO: 490 y SEQ ID NO: 489 abajo:

A02_Rd4_0,6nM_C01 *región variable de la cadena pesada*

GAAGTTCAATTATTGGAATCTGGTGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGA
GACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAACTGGGT
GCGCCAGGCCCCTGGTAAAGGTTTGGAATGGGTTTCTGCTATTACTGCGTCTGGT
GGTTCTACTTACTATGCCGATGTGGTTAAGGGTAGATTCACCATTTCTAGAGACAA
CTCTAAGAACACCTTGTACTTGCAAATGAACTCCTTGAGAGCTGAAGATACTGCTG
TTTATTACTGTGCTAGATACTGGCCAATGTCGTTGTGGGGTCAAGGTACTCTGGTC
ACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 490)

A02_Rd4_0,6nM_C01 *región variable de la cadena ligera*

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACCCTGAGCCTGTCTCCTGGTGAAAGA
GCTACTTTGTCTTGTAGAGCTTCTCAATCCGTTTCCGCGTATTATTTGGCTTGGTAT
CAACAAAAACCAGGTCAAGCTCCAAGATTATTGATGTACGATGCTTCTATTAGAGC
CACCGGTATTCCAGATAGATTTTCTGGTTCTGGTTCCGGTACTGATTTCACTTTGAC
TATCTCTAGATTGGAACCAGAAGATTTCGCTGTTTACTACTGTCAACAATATGAGCG
TTGGCCATTGACTTTTGGTCAAGGTACAAAGGTTGAAATCAAACGTGAG
(SEQ ID NO: 489)

En otras realizaciones, la composición comprende uno o ambos polinucleótidos mostrados en la SEQ ID NO: 492 y SEQ ID NO: 491 abajo:

A02_Rd4_0,6nM_C16 *región variable de la cadena pesada*

GAAGTTCAATTATTGGAATCTGGTGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGA
GACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAACTGGGT
GCGCCAGGCCCCTGGTAAAGGTTTGGAATGGGTTTCTGCTATTTCTGATTTTGGTG
GTTCTACTTACTATGCCGATATCGTTAAGGGTAGATTCACCATTTCTAGAGACAACT
CTAAGAACACCTTGTACTTGCAAATGAACTCCTTGAGAGCTGAAGATACTGCTGTT
TATTACTGTGCTAGATACTGGCCAATGGATATTTGGGGTCAAGGTACTCTGGTCAC
CGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 492)

A02_Rd4_0,6nM_C16 *región variable de la cadena ligera*

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACCCTGAGCCTGTCTCCTGGTGAAAGA
GCTACTTTGTCTTGTAGAGCTTCTCAATCCGTTTCCGATCTGTATTTGGCTTGGTAT
CAACAAAAACCAGGTCAAGCTCCAAGATTATTGATGTACGATGCTTCTATTAGAGC
CACCGGTATTCCAGATAGATTTTCTGGTTCTGGTTCCGGTACTGATTTCACTTTGAC
TATCTCTAGATTGGAACCAGAAGATTTCGCTGTTTACTACTGTCAACAATATCAGAC
TTGGCCATTGACTTTTGGTCAAGGTACAAAGGTTGAAATCAAACGTGAG
(SEQ ID NO: 491).

En el presente documento se describen además los vectores de expresión y la administración de composiciones de polinucleótidos.

En otro caso, se proporciona un procedimiento para fabricar cualquiera de los polinucleótidos aquí descritos.

También se divulgan los polinucleótidos complementarios a cualquiera de estas secuencias. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNhn, que contienen intrones y se corresponden con una molécula de ADN de manera unívoca, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no es necesario, estar presentes dentro de un polinucleótido, y un polinucleótido puede, pero no es necesario, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción del mismo) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de manera que la inmunoreactividad del polipéptido codificado no disminuye, en relación con una molécula inmunoreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento. Las variantes exhiben preferentemente al menos aproximadamente 70% de identidad, más preferentemente, al menos aproximadamente 80% de identidad, aún más preferentemente, al menos aproximadamente 90% de identidad, y más preferentemente, al menos aproximadamente 95% de identidad con una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo nativo o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para obtener la máxima correspondencia, como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan normalmente comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75, o de 40 a 5 aproximadamente 0, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se hayan alineado de forma óptima.

La alineación óptima de las secuencias para su comparación puede realizarse utilizando el programa Megalign de la suite de software bioinformático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando los parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence y Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358 Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment y Phylogenes pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153 Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17 Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105 Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-

425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles y Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, brechas) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen bases de ácido nucleico o residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia.

Las variantes pueden también, o alternativamente, ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o a una porción o complemento del mismo. Dichas variantes polinucleotídicas son capaces de hibridarse en condiciones moderadamente estrictas con una secuencia de ADN natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Unas "condiciones moderadamente estrictas" adecuadas incluyen el prelavado en una solución de 5 X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); hibridación a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche; seguida de dos lavados a 65°C durante 20 minutos con cada una de las soluciones 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contienen 0,1% SDS.

Tal y como se utiliza en el presente documento, las "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean una fuerza iónica baja y una temperatura alta para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/0,0015 M citrato de sodio/0,1% dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizador, como la formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de FicoII/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampón fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C, seguidos de un lavado de alta intensidad consistente en 0,1 x SSC con EDTA a 55°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores como la longitud de la sonda y similares.

Aquellos con conocimientos normales en el arte apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como el descrito en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en la presente divulgación. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente divulgación. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, aunque no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse mediante técnicas estándar (como la hibridación, la amplificación y/o la comparación de secuencias en bases de datos).

Los polinucleótidos de esta divulgación pueden obtenerse mediante síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis química de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica y no es necesario describirlos en detalle en el presente documento. Un experto en la materia puede utilizar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos utilizando procedimientos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada puede insertarse en un vector adecuado, y el vector, a su vez, puede introducirse en una célula huésped adecuada para su replicación y amplificación, como se explica más adelante. Los polinucleótidos pueden insertarse en las células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido así amplificado puede aislarse de la célula huésped por procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989.

Alternativamente, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología PCR es bien conocida en la técnica y se describe en la Patente de EE.UU. nº 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202 así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

El ARN puede obtenerse utilizando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN se puede aislar utilizando

procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, como se expone en Sambrook et al., 1989, supra, por ejemplo.

Los vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas estándar, o pueden seleccionarse de entre un gran número de vectores de clonación disponibles en el arte. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar en función de la célula huésped que se pretenda utilizar, los vectores de clonación útiles tendrán generalmente la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer una única diana para una endonucleasa de restricción particular, y/o pueden llevar genes para un marcador que pueda utilizarse en la selección de clones que contengan el vector. Algunos ejemplos adecuados son los plásmidos y los virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son constructos polinucleotídicos replicables que contienen un polinucleótido según la divulgación. Se da por supuesto que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped, ya sea como episomas o como parte integrante del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, entre otros, los plásmidos, los vectores virales, incluidos los adenovirus, los virus adeno-asociados, los retrovirus, los cósmidos y los vectores de expresión divulgados en la Publicación PCT nº WO 87/04462. Los componentes del vector generalmente pueden incluir, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcional adecuados (como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción), también suelen ser necesarios uno o más elementos de control de la traducción, como los sitios de unión a los ribosomas, los sitios de iniciación de la traducción y los codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de un número de medios apropiados, incluyendo la electroporación, la transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; el bombardeo de microproyectos; la lipofección; y la infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

También se describen en el presente documento células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos. Puede utilizarse cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés.Ejemplos no limitantes de células huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a las células COS, HeLa y CHO. Véase también Publicación PCT nº WO 87/04462. Las células huésped no mamíferas adecuadas incluyen procariotas (como *E. coli* o B. *subtillis*) y levaduras (como S. *cerevisae, S. pombe;* o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel aproximadamente 5 veces mayor, más preferentemente, 10 veces mayor, incluso más preferentemente, 20 veces mayor que el del correspondiente anticuerpo endógeno o proteína de interés, si está presente, en las células huésped. El cribado de las células huésped para una unión específica a BCMA o a un dominio BCMA (por ejemplo, los dominios 1-4) se realiza mediante un inmunoensayo o FACS. Se puede identificar una célula que sobreexprese el anticuerpo o la proteína de interés.

Los materiales representativos descriptos en el presente documento se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC) el 15 de abril de 2015. El vector con número de acceso ATCC PTA-122094 es un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo BCMA humanizado, y el vector con número de acceso ATCC PTA-122093 es un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo BCMA humanizado. Los depósitos se realizaron en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes y su reglamento (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del yacimiento durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito será puesto a disposición por el ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Pfizer, Inc. y el ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo del depósito al público tras la emisión de la patente estadounidense pertinente o tras la puesta a disposición del público de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a quien el Comisionado de Patentes y Marcas de EE.UU. determine que tiene derecho a ella de acuerdo con la Sección 122 del 35 U.S.C. y las normas del Comisionado en virtud de la misma (incluida la Sección 1.14 del 37 C.F.R. con especial referencia al 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera, se perdiera o se destruyera cuando se cultivara en condiciones adecuadas, los materiales serán sustituidos rápidamente, previa notificación, por otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Anticuerpos CD3 y procedimientos de fabricación de los mismos

La siguiente divulgación relativa a los anticuerpos CD3 es útil para comprender la invención. Los anticuerpos distintos de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio variable del anticuerpo que se une específicamente

a CD3 y un segundo dominio variable del anticuerpo que se une específicamente a BCMA y que comprende las secuencias respectivas tal como se definen en las reivindicaciones, no están comprendidos en el objeto reivindicado pero se consideran útiles para comprender la invención.

La presente divulgación proporciona además un anticuerpo que se une a CD3 (por ejemplo, CD3 humano (SEQ ID NO: 502; o número de acceso: NM_000733

MQSGTRWRVL GLCLLSIGVW GQDGNEEMGS ITQTPYQVSI SGTTVILTCS

QHLGSEAQWQ HNGKNKEDSG DRLFLPEFSE MEQSGYYVCY PRGSNPEDAS

HHLYLKARVC ENCMEMDVMA VATIVIVDIC ITLGLLLLVY YWSKNRKAKA

KPVTRGAGAG GRQRGQNKER PPPVPNPDYE PIRKGQQDLY SGLNQRRI

(SEQ ID NO: 502)

En un caso, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CD3, en el que el anticuerpo comprende una VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 320, 322, 324, 326, 328, 330, 345, 347, 349, 351, 444, 354, 356, 378, 442, 380, 382, 384 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398 o 400; y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 319, 321, 323, 325, 327, 329, 344, 346, 348, 350, 352, 355, 377, 443, 445, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397 o 399.

En otro caso, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CD3, en el que la región VH comprende (i) una región determinante de complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 331, 332, 333, 401, 402, 403, 407, 408, 415, 416, 418, 419, 420, 424, 425, 426, 446, 447, o 448 (ii) una VH CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 334, 336, 337, 338, 339, 404, 405, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 417, 418, 421, 422, 427, 428, 449 o 450; y iii) una VH CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 335, 406, 423, 429 o 451; y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que comprenda (i) una CDR1 de VL que comprenda la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 340, 343, 430, 431, 435, o 440, 441; (ii) una VL CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 341, 433, 452, o 436; y (iii) una VL CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 342, 432, 434, 437, 438, 439, 446 o 453.

En algunos casos, se proporciona un anticuerpo que tiene cualquiera de las secuencias parciales de cadena ligera enumeradas en la Tabla 3 y/o cualquiera de las secuencias parciales de cadena pesada enumeradas en la Tabla 3.

Tabla 3

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
h2B4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**T SSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQKP GQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 319)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAF**IRNRARGYT**SDHNASVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 320)
h2B4-VH-wt VL_TK	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQK PGQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 321)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAF**IRNRARGYT**SDHNASVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 322)
h2B4-VH-hnps VL_TK		

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQK PGQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 323)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAFI**RNRARGYT**SDHNPSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 324)
h2B4-VH-yaes VL_TK	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQK PGQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 325)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAFI**RNRARGYT**SDYAESVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 326)
h2B4-VH-yads VL_TK	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQK PGQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 327)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAFI**RNRARGYT**SDYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 328)
h2B4-VH-yaps VL_TK	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**T SSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQKP GQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 329)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAFI**RNRARGYT**SDYAPSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 330)
h2B4-VH-hnps VL TK S55Y	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQK PGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 344)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAFI**RNRARGYT**SDHNPSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 345)
h2B4-VH-hnps VL_TK-S105Q	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQK PGQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC**KQSYDLFT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 346)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS**GFTFSDY**YMTWVRQAPGKGLE WVAFI**RNRARGYT**SDHNPSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**DRPSYYVLDY**WGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 347)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
h2B4-VH-hnpsVL_TK - S55Y/ S105Q	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSLFNVRSRKNYLA**WYQQK PGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC**KQSYDLFT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 348)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDYYMTWVRQAPGKGLE WVAFIRNRARGYTSDHNPSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDRPSYYVLDYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 349)
2B4	DIVMSQSPPSLAVSVGDKVTMSC **TSSQSLFNSRSRKNYLA**WYQQK SGQSPKLLIS**WASTRES**GVPDRF TGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV YYC**KQSYDLFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 350)	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TFGFTFTDYYMTWVRQPPGKALE WVAFIRNRARGYTSDHNASVKGR FTISRDNSQNILYLQMNTLRAEDS ATYYCARDRPSYYVLDYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 351)
h2B4-11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**T SSQSLFNSRSRKNYLA**WYQQKP GQPPKLLIS**WASTRES**GVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QQSYDTFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 445)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDYYMTWVRQAPGKGLE WVAFIRNRARGYTSDHNASVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDRPSYYVLDYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 444)
1C10	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSC **KSSQSLLNSRTRKNY**LAWYQQK PGQSPKLLIY**WASTRES**GVPDRF TGSGSGTDFTLTIDSVQPEDLAV YYC**TQSFILRT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 352)	QVQLQQPGSELVRPGASVILSCKA SGYTFTSYWMHWVRQRPGQGLE WIGNIYSGGDTINYDEKFKNKAILT VDTSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYY CTRDATSRYFFDYWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO: 354)
1A4	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSC **KSSQSLLNSRTRKNY**LAWYQQK PGQSPKLLIY**WASTRAS**GVPDRF TGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIY Y**CKQSFILRT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 355)	QVQLQQSGPDLVKPGASVEISCK ASGYSFTTYYLHWVRQRPGQGLE WIGWIFPGSDNTKYNEKFKGKATL TADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY FCARNRDYYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 356)
7A3	DIVVSQSPSSLAVSAGEKVIMSC **KSSQSLLNSRTRKNY**LAWYQLK PGQSPKLLIY**SASTRES**GVPDRF TGSGSGTDFTLTISSVQTEDLAV YYC**MQSFTLRT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 443)	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCK GSGFNIKDYYIHWVKQRPEQGLE WIGWIDPENGNNKYDPKFQGKASI TADTSSNIAYLQLSSLTSEDTAVYY CARNDNYAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 442)
25A8	QAVVTQESALTTSPGEAVTLTC**R SSTGAVTTSNYAN**WVQEKPDHL FTGLIG**GTNTRAP**GVPARFSGSLI GDKAALTITGAQTEDEAIYFC**VL WYNNYWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 377)	EVQLVESGGGLVRPEGSLRLSCA ASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKINNYATYYAESVKGRF TLSRDDSLSMVYLQMNSLKNEDT AMYYCVRHETLRSGISWFASWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 378)
16G7	QAVVTQESALTTSPGETVTLTC**R SSTGAVTTSNYAN**WVQEKPDHL FTGLIG**GTNNRAP**GVPARFSGSL IGDKAALTITGAQTEDEAIYFC**AL WYSNHWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 379)	EVQLVDSGGGLVQPKGSLKLSCA ASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKSNNYATYYADSVKDR FTISRDDSQSRLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHETLRSGISWFANWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 380)

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
h25A8-B5	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYNNYWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 381)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKINNYATYYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHETLRSGISWFASWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 382)
h25A8-B8	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYNNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 383)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKINNYATYYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHETLRSGISWFASWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 384)
h25A8-B12	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR ASTGAVTTSNYANWVQQKPGQ APRGLIGGTNTRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC VLWYNNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 385)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKINNYATYYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHETLRSGISWFASWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 386)
h25A8-B13	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR TSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYNNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 387)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKINNYATYYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHETLRSGISWFASWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 388)
h25A8-C5	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYNNYWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 389)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKINNYATYYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHETLRSGISWFASWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 390)
h25A8-C8	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYNNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 391)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSKINNYATYYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHETLRSGISWFASWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 392)
h25A8-D13	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCR TSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCV LWYNNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 393)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE WVGRIRSHINNYATYYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHETLRSGISWFASWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 394)
h25A8-E13		

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**R** **TSTGAVTTSNYAN**WVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC**V** **LWYNNHWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 395)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA AS**GFTFSTY**AMNWVRQAPGKGLE WVGRI**RSKYNNYA**TYYAESVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT AVYYCVR**HETLRSGISWFAS**WGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 396)
h25A8-F13	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**R** **TSTGAVTTSNYAN**WVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC**V** **LWYNNHWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 397)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA AS**GFTFSTY**AMNWVRQAPGKGLE WVGRE**RSKINNYA**TYYAESVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT AVYYCVR**HETLRSGISWFAS**WGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 398)
h25A8-G13	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**R** **TSTGAVTTSNYAN**WVQQKPGQA PRGLIGGTNTRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC**V** **LWYNNHWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 399)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA AS**GFTFSTY**AMNWVRQAPGKGLE WVGRI**RSKINNYKT**YYAESVKGRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCVR**HETLRSGISWFAS**WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 400)

En la Tabla 3, las secuencias subrayadas son secuencias CDR según Kabat y en negrita según Chothia.

También se proporcionan las porciones de CDR de anticuerpos contra CD3 (incluyendo Chothia, CDR de Kabat y regiones de contacto de CDR). La determinación de las regiones CDR es algo que está dentro de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también denominadas "CR combinados" o "CDR ampliadas"). En algunas realizaciones, las CDRs son las CDRs de Kabat. En otras realizaciones, las CDR son las CDR de Chothia. En otras palabras, en las realizaciones con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de las CDR de Kabat, Chothia, combinadas, o combinaciones de las mismas. La Tabla 4 proporciona ejemplos de secuencias CDR proporcionadas en el presente documento.

Tabla 4

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
h2B4	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNASVKG (SEQ ID NO: 334) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-VH-wt VL TK	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNASVKG (SEQ ID NO: 334) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-VH-hnps VL_TK	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNPSVKG (SEQ ID NO: 336) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-VH-yaes VL_TK	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDYAESVKG (SEQ ID NO: 337) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-VH-yads VL_TK	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDYADSVKG (SEQ ID NO: 338) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-VH-yaps VL_TK	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDYAPSVKG (SEQ ID NO: 339) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-VH-hnps VL_TK - S55Y	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNPSVKG (SEQ ID NO: 336) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
h2B4-VH-hnps VL_TK - S105Q	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNPSVKG (SEQ ID NO: 336) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-VH-hnps VL_TK- S55Y/ S105Q	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNPSVKG (SEQ ID NO: 336) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
2B4	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFTDY (SEQ ID NO: 415) (Chothia); GFTFTDYYMT (SEQ ID NO: 416) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNASVKG (SEQ ID NO: 418) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
h2B4-11	DYYMT (SEQ ID NO: 331) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 332) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 333) (Ampliada)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 417) (Chothia) FIRNRARGYTSDHNASVKG (SEQ ID NO: 418) (Kabat)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 335)
1C10	SYWMH (SEQ ID NO: 418) (Kabat) GYTFTSY (SEQ ID NO: 419) (Chothia) GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 420) (Ampliada)	YSGGDT (SEQ ID NO: 421) (Chothia) NIYSGGDTINYDEKFKN (SEQ ID NO: 422) (Kabat)	DATSRYFFDY(SEQID NO: 423)
1A4	TYYLH (SEQ ID NO: 424) (Kabat) GYSFTTYY (SEQ ID NO: 425) (Chothia) GYSFTTYYLH (SEQ ID NO: 426) (Ampliada)	FPGSDN (SEQ ID NO: 427) (Chothia) WIFPGSDNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 428) (Kabat)	NRDYYFDY (SEQ ID NO: 429)
7A3	DYYIH (SEQ ID NO: 446) (Kabat) GFNIKDY(SEQ ID NO: 447) (Chothia) GFNIKDYYIH (SEQ ID NO: 448) (Ampliada)	DPENGN (SEQ ID NO: 449) (Chothia) WIDPENGNNKYDPKFQG (SEQ ID NO: 450) (Kabat)	NDNYAFDY (SEQ ID NO: 451)
25A8	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFNTY (SEQ ID NO: 402) (Chothia); GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 403) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
16G7	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFNTY (SEQ ID NO: 402) (Chothia); GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 403) (Ampliada)	RSKSNNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKSNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA N (SEQ ID NO: 406)
h25A8- B5	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8- B8	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8- B12	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8-B13	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8-C5	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFNTY (SEQ ID NO: 402) (Chothia); GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 403) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8-C8	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFNTY (SEQ ID NO: 402) (Chothia); GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 403)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 405) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8-D13	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSHINNYA (SEQ ID NO: 409) (Chothia) RIRSHINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 410) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)

(continuación)

Cadena pesada			
mAb	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**
h25A8-E13	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSKYNNYA (SEQ ID NO: 411) (Chothia) RIRSKYNNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 412) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8-F13	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RERSKINNYATYYAESVKG (SEQ ID NO: 413) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
h25A8-G13	TYAMN (SEQ ID NO: 401) (Kabat); GFTFSTY (SEQ ID NO: 407) (Chothia); GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 408) (Ampliada)	RSKINNYA (SEQ ID NO: 404) (Chothia) RIRSKINNYKTYYAESVKG (SEQ ID NO: 414) (Kabat)	HETLRSGISWFA S (SEQ ID NO: 406)
Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
h2B4	TSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 340)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
h2B4-VH-wt VL TK	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
h2B4-VH-hnps VL_TK	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
h2B4-VH-yaes VL_TK	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
h2B4-VH-yads VL_TK	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
h2B4-VH-yaps VL_TK	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
2B4	TSSQSLFNSRSRKN YLA (SEQ ID NO: 430)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
h2B4-11	TSSQSLFNSRSRKN YLA (SEQ ID NO: 430)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	QQSYDTFT (SEQ ID NO: 446)
1C10	KSSQSLLNSRTRKN Y (SEQ ID NO: 431)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	TQSFILRT (SEQ ID NO: 432)
1A4	KSSQSLLNSRTRKN Y (SEQ ID NO: 431)	WASTRAS (SEQ ID NO: 433)	KQSFILRT (SEQ ID NO: 434)
7A3	KSSQSLLNSRTRKN Y (SEQ ID NO: 431)	SASTRES (SEQ ID NO: 452)	MQSFTLRT (SEQ ID NO: 453)
h2B4-VH-hnps VL_TK - S55Y	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
h2B4-VH-hnps VL_TK - S105Q	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
h2B4-VH-hnps VL_TK - S55Y/ S105Q	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 343)	WASTRES (SEQ ID NO: 341)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 342)
25A8	RSSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 435)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNYWV (SEQ ID NO: 437)
16G7	RSSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 435)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 438)
h25A8-B5	RSSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 435)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNYWV (SEQ ID NO: 437)
h25A8-B8	RSSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 435)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)
h25A8-B12	RASTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 440)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)
h25A8-B13	RTSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 441)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)
h25A8-C5	RSSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 435)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNYWV (SEQ ID NO: 437)
h25A8-C8	RSSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 435)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)
h25A8-D13	RTSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 441)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)
h25A8-E13	RTSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 441)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)
h25A8-F13	RTSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 441)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)

(continuación)

Cadena ligera			
mAb	**CDRL1**	**CDRL2**	**CDRL3**
h25A8-G13	RTSTGAVTTSNYAN(SEQID NO: 441)	GTNTRAP (SEQ ID NO: 436)	VLWYNNHWV (SEQ ID NO: 439)

También se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos de la divulgación, y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

En un caso, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica la cadena pesada y/o las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo h2B4, h2B4-VH-wt VL_TK, h2B4-VH-hnps VL_TK, h2B4-VH-yaes VL_TK, h2B4-VH-yads VL_TK, h2B4-VH-yaps VL_TK, h2B4-VH-hnps VL_TK-S55Y, h2B4-VH-hnps VL_TK-S105Q, h2B4-vH-hnps VL_TK-S55Y/S105Q, 2B4, h2B4-11, 1C10, 1A4, 7A3, 25A8, 16G7, h25A8-B5, h25A8-B8, h25A8-B12, h25A8-B13, h25A8-C5, h25A8-C8, h25A8-D13, h25A8-E13, h25A8-F13, o h25A8-G13. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede entonces expandirse y congelarse para su uso futuro. En el presente documento se describen con más detalle los vectores (incluidos los vectores de expresión) y las células huésped.

Los materiales representativos del anticuerpo CD3 de la presente divulgación se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC) el 11 de septiembre de 2015. El vector con número de acceso ATCC PTA-122513 es un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo CD3 humanizado, y el vector con número de acceso ATCC PTA-122512 es un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo CD3 humanizado. Los depósitos se realizaron en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes y su reglamento (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del yacimiento durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito será puesto a disposición por el ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Pfizer, Inc. y el ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo del depósito al público tras la emisión de la patente estadounidense pertinente o tras la puesta a disposición del público de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, lo que ocurra primero,, y asegura la disponibilidad de la progenie a quien el Comisionado de Patentes y Marcas de EE.UU. determine que tiene derecho a ella de acuerdo con la Sección 122 del 35 U.S.C. y las normas del Comisionado en virtud de la misma (incluida la Sección 1.14 del 37 C.F.R. con especial referencia al 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera o se perdiera o destruyera al ser cultivado en condiciones adecuadas, los materiales serán sustituidos rápidamente, previa notificación, por otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

Anticuerpos biespecíficos y procedimientos de fabricación

Los anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, pueden prepararse utilizando los anticuerpos aquí divulgados. Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210, 1986). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basaba en la coexpresión de dos pares de inmunoglobulinas de cadena pesada-cadena ligera, con las dos cadenas pesadas de diferente especificidad (Millstein y Cuello, Nature 305, 537-539, 1983).

Según un enfoque para fabricar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de la región constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las relaciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en los casos en las que las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en el constructo proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da lugar a altos rendimientos o cuando las relaciones no son especialmente significativas.

En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada de inmunoglobulina híbrida-cadena ligera (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación PCT nº WO 94/04690.

En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de la modificación de aminoácidos en la primera región bisagra en un brazo, y el aminoácido sustituido/reemplazado en la primera región bisagra tiene una carga opuesta al aminoácido correspondiente en la segunda región bisagra en otro brazo. Este enfoque se describe en la solicitud de patente internacional No. PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

En otro enfoque, la formación de una proteína heteromultimérica o heterodimérica deseada (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) se mejora mediante la alteración o ingeniería de una interfaz entre una primera y una segunda región Fc similar a la inmunoglobulina (por ejemplo, una región bisagra y/o una región CH3). En este enfoque, los anticuerpos biespecíficos pueden estar compuestos por una región CH3, en la que la región CH3 comprende un primer polipéptido CH3 y un segundo polipéptido CH3 que interactúan juntos para formar una interfaz CH3, en la que uno o más aminoácidos dentro de la interfaz CH3 desestabilizan la formación del homodímero y no son electrostáticamente desfavorables para la formación del homodímero. Este enfoque se describe en la solicitud de patente internacional No. PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos pueden generarse utilizando una etiqueta peptídica que contenga glutamina, diseñada para el anticuerpo dirigido a un epítopo (por ejemplo, BCMA) en un brazo y otra etiqueta peptídica (por ejemplo, una etiqueta peptídica que contenga Lys o una Lys endógena reactiva) diseñada para un segundo anticuerpo dirigido a un segundo epítopo en otro brazo en presencia de transglutaminasa. Este enfoque se describe en la solicitud de patente internacional núm PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

En otro caso, la proteína heterodimérica (por ejemplo, el anticuerpo biespecífico) tal como se describe en el presente documento comprende un anticuerpo humano de longitud completa, en el que un primer dominio variable del anticuerpo de la proteína heterodimérica es capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana mediante la unión específica a un antígeno efector situado en la célula efectora inmunitaria humana, y en el que un segundo dominio variable del anticuerpo de la proteína heterodimérica es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana. En algunos casos, el anticuerpo humano tiene un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos casos, la proteína heterodimérica comprende una región Fc inmunológicamente inerte.

La célula inmune efectora humana puede ser cualquiera de una variedad de células inmunes efectoras conocidas en el arte. Por ejemplo, la célula efectora inmunitaria puede ser un miembro del linaje celular linfoide humano, incluyendo, pero sin limitarse a, una célula T (por ejemplo, una célula T citotóxica), una célula B y una célula asesina natural (NK). La célula efectora inmune también puede ser, por ejemplo sin limitación, un miembro del linaje mieloide humano, incluyendo, pero sin limitarse a, un monocito, un granulocito neutrófilo y una célula dendrítica. Dichas células efectoras inmunitarias pueden tener un efecto citotóxico o apoptótico sobre una célula diana u otro efecto deseado tras la activación por la unión de un antígeno efector.

El antígeno efector es un antígeno (por ejemplo, una proteína o un polipéptido) que se expresa en la célula inmune efectora humana. El antígeno efector que pueden ser unidos por un anticuerpo biespecífico) es CD3 humano (o complejo CD3 (Cluster of Differentiation)).

La célula diana puede ser una célula nativa o extraña a los humanos. En una célula diana nativa, la célula puede haber sido transformada para ser una célula maligna o modificada patológicamente (por ejemplo, una célula diana nativa infectada con un virus, un plasmodio o una bacteria). En una célula objetivo extraña, la célula es un patógeno invasor, como una bacteria, un plasmodio o un virus.

El antígeno diana se expresa en una célula diana en una condición de enfermedad (por ejemplo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa (por ejemplo, cáncer), un trastorno inmunológico, una enfermedad neurológica, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa (por ejemplo, una infección viral o una infección parasitaria), una reacción alérgica, una enfermedad de injerto contra huésped o una enfermedad de huésped contra injerto). Un antígeno objetivo no es un antígeno efector. El antígeno diana es BCMA

En algunos casos, la proteína heterodimérica (por ejemplo, el anticuerpo biespecífico) como se describe en el presente documento comprende un anticuerpo humano de longitud completa, en el que un primer dominio variable de anticuerpo de la proteína heterodimérica es capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana mediante la unión específica a un antígeno efector (antígeno CD3) situado en la célula efectora inmunitaria humana, en el que un segundo dominio variable de anticuerpo de la proteína heterodimérica es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana (BCMA), donde el primer y segundo dominio variable de anticuerpo de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 223, 225 y 228 (por ejemplo, (C223E o C223R),

(E225R) y (P228E o P228R)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, K409R o L368E (esquema de numeración EU)) en la región CH3 de la IgG2 humana (SEQ ID NO: 493.

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSD
(SEQ ID NO: 493)

En algunos casos. el primer y segundo dominios variables de anticuerpos del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 221 y 228 (por ejemplo, (D221R o D221E) y (P228R o P228E)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, K409R o L368E (esquema de numeración de la UE)) en la región CH3 de la IgG1 humana (SEQ ID NO: 494.

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGF
(SEQ ID NO: 494)

En algunos casos, el primer y segundo dominios variables de anticuerpos del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 228 (por ejemplo, (P228E o P228R)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, R409 o L368E (esquema de numeración EU)) en la región CH3 de la IgG4 humana (SEQ ID NO: 495.

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGF
(SEQ ID NO: 495)

En otra realización, el primer dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3 de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 324; y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 323; y el segundo dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3 de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 112; y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 38.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (incluidos los anticuerpos quiméricos o humanizados).

En algunos casos, el anticuerpo BCMA o CD3 descrito aquí es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, el anticuerpo BCMA o CD3 es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal quimérico.

En algunos casos, el anticuerpo comprende una región constante modificada, como, por ejemplo, sin limitación, una región constante que tiene un mayor potencial para provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la región constante puede modificarse para que tenga mayor afinidad con un receptor Fc gamma como, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIA o FcγIII.

En algunos casos, el anticuerpo comprende una región constante modificada, como una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999 Solicitud PCT nº PCT/GB99/01441y/o Solicitud de patente del Reino Unido nº 98099518. El Fc puede ser IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana. El Fc puede ser una IgG2 humana que contenga la mutación A330P331 a S330S331 (IgG2Δa), en la que los residuos de aminoácidos están numerados con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo salvaje. Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG_4 que comprende las siguientes mutaciones (Armour et al., Molecular Immunology 40 585-593, 2003): E233F234L235 a P233V234A235 (IgG4Δc), en la que la numeración es con referencia a la IgG4 de tipo salvaje. En otra realización, el Fc es IgG_4 humana E233F234L235 a P233V234A235 con deleción G236 (IgG4Δb). En otra realización, el Fc es cualquier Fc IgG_4 humano (IgG4, IgG4Δb o IgG4Δc) que contenga la mutación estabilizadora de bisagra S228 a P228 (Aalberse et al., Immunology 105, 9-19, 2002). En otra realización, el Fc puede ser un Fc aglucosilado.

En algunos casos, la región constante se aglutina mutando el residuo de unión del oligosacárido (tal como Asn297) y/o los residuos flanqueantes que forman parte de la secuencia de reconocimiento de la glicosilación en la región constante. En algunos casos, la región constante se aglutina para la glicosilación ligada al N enzimáticamente. La región constante puede ser aglucosilada para la glicosilación ligada a N enzimáticamente o por expresión en una célula huésped deficiente en glicosilación.

En algunas realizaciones, la región constante tiene una región constante modificada que elimina o reduce la unión del receptor Fc gamma. Por ejemplo, el Fc puede ser una IgG2 humana que contenga la mutación D265, en la que los residuos de aminoácidos están numerados con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 493. En consecuencia, en algunas realizaciones, la región constante tiene una región constante modificada que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 496:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCRVRCPRCPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

En algunas realizaciones, la región constante tiene una región constante modificada que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 497:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCEVECPECPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Una forma de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos a BCMA o CD3 es midiendo la afinidad de unión de los fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede ser escindido con papaína o expresado recombinantemente. La afinidad de un fragmento Fab de BCMA de un anticuerpo puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore™3000™, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipado con chips sensores de estreptavidina preinmovilizados (SA) o Fc antiratón o Fc antihumano utilizando el tampón de funcionamiento HBS-EP (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v Surfactant P20). El BCMA

humano biotinilado o de fusión Fc puede diluirse en el tampón HBS-EP hasta una concentración inferior a 0,5 µg/ml e inyectarse a través de los canales individuales del chip utilizando tiempos de contacto variables, para conseguir dos intervalos de densidad de antígeno, bien 50-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados o 800-1,000 RU para ensayos de cribado. Los estudios de regeneración han demostrado que 25 mM de NaOH en 25% v/v de etanol eliminan eficazmente el Fab unido mientras mantienen la actividad de BCMA en el chip durante más de 200 inyecciones. Normalmente, se inyectan diluciones en serie (que abarcan concentraciones de 0,1 a 10 veces la K_D estimada) de muestras de Fab purificado durante 1 minuto a 100 µl/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan mediante ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE utilizando un Fab de concentración conocida (determinada por el análisis de aminoácidos) como estándar. Las tasas de asociación cinética (k_{activo}) y las tasas de disociación ($k_{inactivo}$) se obtienen simultáneamente ajustando los datos globalmente a un modelo de unión 1:1 de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Procedimientos de Enzimología 6. 99-110) utilizando el programa BIAevaluación. Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculan como $k_{inactivo}/k_{activo}$. Este protocolo es adecuado para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier BCMA, incluyendo el BCMA humano, el BCMA de otro mamífero (como el BCMA de ratón, el BCMA de rata o el BCMA de primate), así como diferentes formas de BCMA (por ejemplo, el BCMA glicosilado). La afinidad de unión de un anticuerpo se mide generalmente a 25°C, pero también puede medirse a 37°C.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden hacerse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Para la producción de líneas celulares de hibridoma, la ruta y el calendario de inmunización del animal huésped se ajustan generalmente a las técnicas establecidas y convencionales de estimulación y producción de anticuerpos, como se describe más adelante. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón son conocidas en la técnica y/o se describen en el presente documento.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero, incluidos los seres humanos, o las células productoras de anticuerpos de los mismos, pueden ser manipulados para servir de base para la producción de líneas celulares de mamíferos, incluidos los humanos y los hibridomas. Típicamente, el animal huésped es inoculado por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en el presente documento.

Los hibridomas pueden prepararse a partir de los linfocitos y las células de mieloma inmortalizadas utilizando la técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C., Nature 256:495-497, 1975 o modificada por Buck, D. W., et al., In Vitro, 18:377-381, 1982. En la hibridación pueden utilizarse las líneas de mieloma disponibles, incluyendo, pero sin limitarse a, X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU. En general, la técnica consiste en fusionar las células de mieloma y las células linfoides utilizando un fusógeno como el polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la materia. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, como el medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en el presente documento, complementado con o sin suero, puede utilizarse para el cultivo de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, pueden utilizarse células B inmortalizadas por el VEB para producir los anticuerpos monoclonales. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se analizan para determinar la actividad antiinmunógena mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que pueden utilizarse como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células progenitoras de los hibridomas originales que producen anticuerpos monoclonales específicos para BCMA, CD3 o porciones de los mismos.

Los hibridomas que producen dichos anticuerpos pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* utilizando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse del medio de cultivo o de los fluidos corporales, mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como la precipitación con sulfato de amonio, la electroforesis en gel, la diálisis, la cromatografía y la ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, haciendo pasar la preparación por adsorbentes hechos con el inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. Inmunización de un animal huésped con un BCMA o CD3 humano, o un fragmento que contenga la secuencia de aminoácidos diana conjugado con una proteína que sea inmunógena en la especie a inmunizar, por ejemplo hemocianina de lapa de ojo de cerradura, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl2, o $R^1N=C=NR$, donde R y R^1 son grupos alquilos diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Si se desea, el anticuerpo (monoclonal o policlonal) de interés puede ser secuenciado y la secuencia de polinucleótidos puede entonces ser clonada en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y ésta puede expandirse y congelarse para su uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular puede llevarse a cabo mediante

la clonación de genes de anticuerpos de células B por medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Tiller et al., J. Immunol. Methods 329, 112, 2008 Pat. de EE.UU. Nº 7.314.622.

En una alternativa, la secuencia de polinucleótidos puede ser utilizada para la manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede ser diseñada para parecerse más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se utiliza en ensayos clínicos y tratamientos en humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener una mayor afinidad con BCMA o CD3 y una mayor eficacia en la inhibición de BCMA.

Hay cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y aminoácidos prevista de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco del anticuerpo se utilizará durante el proceso de humanización (3) las metodologías/técnicas de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Pat. U.S. Nº 4.816.567, 5.807.715, 5.866.692, 6.331.415, 5.530.101, 5.693.761, 5.693.762, 5.585.089, y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpos "humanizados" que comprenden un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedores o de roedores modificados y sus CDR asociadas fusionadas a regiones constantes humanas. Véase, por ejemplo, Winter et al. Nature 349:293-299, 1991, Lobuglio et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224, 1989, Shaw et al. *Immunol.* 138:4534-4538, 1987 y Brown et al. Cancer Res. 47, 525 a 1987). Otras referencias describen CDRs de roedores injertados en una región marco de soporte (FR) humana antes de la fusión con una región constante de anticuerpos humanos apropiada. Véase, por ejemplo, Riechmann et al. Nature 332:323-327, 1988, Verhoeyen et al. Science 239:1534-1536, 1988y Jones et al. Nature 321:522-525, 1986. Otra referencia describe CDRs de roedores apoyados por regiones marco de roedores de ingeniería recombinante. Véase, por ejemplo, La publicación de la patente europea nº 0519596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia las moléculas de anticuerpos antihumanos de los roedores, lo que limita la duración y la eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esas moléculas en los receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo puede diseñarse de forma que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, que no desencadene la lisis del complemento). Véase, por ejemplo, la publicación PCT No PCT/GB99/01441, Solicitud de patente del Reino Unido nº 9809951.8. Otros procedimientos de humanización de anticuerpos que también pueden utilizarse son los descritos por Daugherty et al., Nucl. Acids Res. 19:2471,-2476, 1991, y en la Pat. de los EE.UU. Números 6.180.377, 6.054.297, 5.997.867, 5.866.692, 6.210.671, y 6.350.861, y en la Publicación PCT nº WO 01/27160.

Los principios generales relacionados con los anticuerpos humanizados discutidos anteriormente también son aplicables a la personalización de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Además, pueden combinarse uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, el injerto de CDR, la mutación del marco y la mutación de CDR.

En una variación, los anticuerpos totalmente humanos pueden obtenerse utilizando ratones disponibles en el mercado que han sido diseñados para expresar proteínas de inmunoglobulina humanas específicas. Los animales transgénicos diseñados para producir una respuesta inmunitaria más deseable (por ejemplo, anticuerpos totalmente humanos) o más robusta también pueden utilizarse para generar anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de esta tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos pueden ser hechos recombinantemente y expresados usando cualquier procedimiento conocido en el arte. En otra alternativa, los anticuerpos pueden fabricarse de forma recombinante mediante la tecnología de visualización de fagos. Véase, por ejemplo, La Pat. de los EE.UU. Nº 5.565.332, 5.580.717, 5.733.743, y 6.265.150, y Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 525 a 1994). Como alternativa, la tecnología de visualización de fagos (McCafferty et al., Nature 348:552-553, 1990) puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro,* a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de los anticuerpos se clonan dentro del marco de un gen de la proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como M13 o fd, y se muestran como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La visualización de fagos puede realizarse en una variedad de formatos; para una revisión, véase, por ejemplo Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571, 1993. Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos de genes V para la visualización de fagos. Clackson et al., Nature 352:624-628, 1991Clackson et al., aislaron un conjunto diverso de anticuerpos contra la oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra una gama diversa de antígenos (incluidos los autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991o Griffith et al., EMBO J. 12:725-734, 1993. En una respuesta inmunitaria natural, los genes de los anticuerpos acumulan mutaciones a un

ritmo elevado (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad, y los linfocitos B que muestran inmunoglobulinas de superficie de alta afinidad se replican y diferencian preferentemente durante la posterior provocación de antígenos. Este proceso natural puede imitarse empleando la técnica conocida como "barajar en cadena" (Marks et al., Bio/Technol. 10, 525 a 1992). En este procedimiento, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por visualización de fagos puede mejorarse sustituyendo secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera por repertorios de variantes naturales (repertorios) de genes del dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo pM-nM. Una estrategia para hacer repertorios de anticuerpos fágicos muy grandes (también conocida como "la madre de todas las bibliotecas") ha sido descrita por Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21, 525 a 1993). La mezcla de genes también puede utilizarse para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, cuando el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo de roedor de partida. Según este procedimiento, que también se denomina "impresión de epítopos", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos de roedores obtenidos mediante la técnica de despliegue de fagos se sustituye por un repertorio de genes del dominio V humano, creando quimeras roedor-humano. La selección sobre el antígeno tiene como resultado el aislamiento de las regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión al antígeno funcional, es decir, el epítopo gobierna (imprime) la elección de la pareja. Cuando se repite el proceso para sustituir el dominio V restante del roedor, se obtiene un anticuerpo humano (véase Publicación PCT nº WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos de roedores mediante el injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen marco ni residuos de CDR de origen roedor.

Los anticuerpos pueden fabricarse de forma recombinante aislando primero los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de los animales huéspedes, obteniendo la secuencia genética y utilizando la secuencia genética para expresar el anticuerpo de forma recombinante en las células huéspedes (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han divulgado procedimientos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, et al. Vaccine 19:2756, 2001 Lonberg, N. y D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65, 1995; y Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147, 1999. Los procedimientos para fabricar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena única, etc., son conocidos en la técnica.

Los inmunoensayos y las técnicas de clasificación por citometría de flujo, como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), también pueden emplearse para aislar anticuerpos que sean específicos para BCMA, o CD3.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden unirse a muchos portadores diferentes. Los portadores pueden ser activos y/o inertes. Algunos ejemplos de portadores conocidos son el polipropileno, el poliestireno, el polietileno, el dextrano, el nailon, las amilasas, el vidrio, las celulosas naturales y modificadas, las poliacrilamidas, las agarosas y la magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble. Los expertos en la materia conocerán otros portadores adecuados para la unión de anticuerpos, o podrán determinarlos mediante la experimentación rutinaria. En algunos casos, el portador comprende una fracción que se dirige al miocardio.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión (como los vectores de expresión divulgados en la Publicación PCT nº WO 87/04462), que a continuación se transfectan en células huésped como células E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen proteínas de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo la Publicación PCT nº WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificadora de las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984 o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos BCMA como se describe en el presente documento pueden ser identificados o caracterizados utilizando procedimientos conocidos en el arte, mediante los cuales se detecta y/o mide BCMA. En algunos casos, un anticuerpo BCMA se identifica incubando un agente candidato con BCMA y monitorizando la unión y/o la reducción concomitante de los niveles de expresión de BCMA. El ensayo de unión puede realizarse con polipéptido(s) BCMA purificado(s), o con células que expresan naturalmente, o transfectadas para expresar, polipéptido(s) BCMA. En un caso, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva, donde se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo BCMA conocido para la unión de BCMA. El ensayo puede realizarse en varios formatos, incluido el formato ELISA.

Después de la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo candidato BCMA, CD3 puede confirmarse y refinarse aún más mediante bioensayos, conocidos para probar las actividades biológicas dirigidas. Como alternativa, se

pueden utilizar bioensayos para examinar directamente a los candidatos. Algunos de los procedimientos para identificar y caracterizar los anticuerpos se describen en detalle en los Ejemplos.

Los anticuerpos BCMA, CD3 pueden caracterizarse utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento consiste en identificar el epítopo al que se une, o "mapeo de epítopos" Existen muchos procedimientos conocidos en la técnica para cartografiar y caracterizar la localización de los epítopos en las proteínas, incluida la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, los ensayos de competencia, los ensayos de expresión de fragmentos de genes y los ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en Capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítopos puede utilizarse para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo. El mapeo de epítopos está disponible comercialmente en varias fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítopo puede ser un epítopo lineal, es decir, contenido en un único tramo de aminoácidos, o un epítopo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que puede no estar necesariamente contenido en un único tramo. Se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, de forma recombinante) péptidos de longitudes variables (por ejemplo, de al menos 4-6 aminoácidos) y utilizarlos para ensayos de unión con un anticuerpo BCMA o CD3. En otro ejemplo, el epítopo al que se une el anticuerpo BCMA, CD3 puede determinarse en un cribado sistemático utilizando péptidos superpuestos derivados de la secuencia de BCMA o CD3 y determinando la unión por el anticuerpo BCMA o CD3. Según los ensayos de expresión de fragmentos de genes, el marco de lectura abierto que codifica BCMA o CD3 se fragmenta al azar o mediante constructos genéticos específicos y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de BCMA o CD3 con el anticuerpo que se va a analizar. Los fragmentos de genes pueden, por ejemplo, producirse por PCR y luego transcribirse y traducirse en proteínas in vitro, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos de BCMA, o CD3 marcados radiactivamente se determina entonces mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. También se pueden identificar determinados epítopos utilizando grandes bibliotecas de secuencias peptídicas aleatorias expuestas en la superficie de partículas de fago (bibliotecas de fago). Alternativamente, una biblioteca definida de fragmentos peptídicos superpuestos puede ser probada para la unión al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, la mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, los experimentos de intercambio de dominios y la mutagénesis de barrido de alanina pueden realizarse para identificar los residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión al epítopo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominios pueden realizarse utilizando un BCMA mutante, CD3 u otro antígeno tumoral en el que varios fragmentos de la proteína BCMA o CD3 han sido sustituidos (intercambiados) con secuencias de BCMA de otra especie (por ejemplo, ratón), o una proteína estrechamente relacionada, pero antigénicamente distinta (por ejemplo, Trop-1). Al evaluar la unión del anticuerpo al BCMA o CD3 mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento particular de BCMA o CD3 para la unión del anticuerpo.

Otro procedimiento que puede utilizarse para caracterizar un anticuerpo BCMA o CD3 es utilizar ensayos de competencia con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, varios fragmentos de BCMA o CD3, para determinar si el anticuerpo BCMA o CD3 se une al mismo epítopo que otros anticuerpos. Los ensayos de competencia son bien conocidos por los expertos en la materia.

Se puede utilizar un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo BCMA o CD3. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena in vivo. Véase, por ejemplo la Pat. de EE.UU. Nº 6.436.908, 6.413.942, y 6.376.471. La administración de los vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo la inyección, la administración oral, la administración con pistola de partículas o con catéter, y la administración tópica. En otro caso, el vector de expresión se administra directamente en el tronco o ganglio simpático, o en una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

También puede utilizarse el suministro dirigido de composiciones terapéuticas que contengan un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de suministro de ADN mediadas por receptores se describen, por ejemplo, en Findeis et al., Trends Biotechnol., 1993, 11:202 Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer, J.A Wolff, ed., 1994 Wu et al., J. Biol. Chem, 263:621, 1988 Wu et al., J. Biol. Chem, 269:542, 1994 Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3655, 1990 y Wu et al., J. Biol. Chem, 266:338, 1991. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para su administración local en un protocolo de terapia génica. Durante un protocolo de terapia génica también pueden utilizarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden administrarse utilizando vehículos de administración de genes. El vehículo de suminsistro de genes puede ser de origen viral o no viral (véase en general, Jolly, Cancer Gene Therapy,1:51, 1994 Kimura, Human Gene Therapy, 5:845, 1994 Connelly, Human Gene Therapy, 1995, 1:185y Kaplitt, Nature Genetics, 6:148, 1994). La expresión de estas secuencias codificantes puede inducirse utilizando promotores endógenos de mamíferos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificadora puede ser constitutiva o regulada.

Los vectores basados en virus para el suministro de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son bien conocidos en el arte. Los vehículos virales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, Publicación PCT nº WO 90/07936 WO 94/03622 WO 93/25698 WO 93/25234 WO 93/11230 WO 93/10218 WO 91/02805 Pat. de EE.UU. Números 5.219.740 y 4.777.127 GB Pat. Nº 2.200.651 y EP

Pat. Nº 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, el virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), el virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y el virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y vectores del virus adeno-asociado (AAV) (véase, por ejemplo Publicación PCT nº WO 94/12649, WO 93/03769 WO 93/19191 WO 94/28938 WO 95/11984 y WO 95/00655). La administración de ADN ligado a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147 también puede emplearse.

También pueden emplearse vehículos y procedimientos de suministro no virales, incluyendo, pero sin limitarse a ello, el ADN condensado policíclico unido o no al adenovirus muerto solo (véase, p. ej, Curiel, Hum. Gene Ther., 3:147, 1992); ADN ligado a ligandos (véase, por ejemplo Wu, J. Biol. Chem., 264:16985, 1989); vehículos de suministro de células eucariotas (véase, por ejemplo U.S. Pat. Nº 5.814.482 Publicación PCT nº WO 95/07994 WO 96/17072 WO 95/30763 y WO 97/42338) y la neutralización o fusión de la carga nucleica con las membranas celulares. También se puede emplear el ADN desnudo. Se describen procedimientos ejemplares de introducción de ADN desnudo en la Publicación PCT nº WO 90/11092 y en la Pat. de EE.UU. Nº 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro de genes se describen en la Pat. de EE.UU. Nº 5.422.120 Publicación PCT nº WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445, y EP 0524968. Otros enfoques se describen en Philip, Mol. Cell Biol., 14:2411, 1994 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:1581, 1994.

En algunos casos, las composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos biespecíficos se describen en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a CD3 y BCMA, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, como excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo tampones, que son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de esta divulgación pueden hacerse por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, por procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos simples o de fusión) como se ha descrito anteriormente o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se fabrican convenientemente por síntesis química. Los procedimientos de síntesis química son conocidos en el arte y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un anticuerpo podría ser producido por un sintetizador automatizado de polipéptidos que emplee el procedimiento de fase sólida. Véase también, las Pat. de EE.UU. Nº 5.807.715, 4.816.567, y 6.331.415.

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente, también están dentro del alcance de la divulgación se han utilizado para dirigir las células del sistema inmunitario hacia las células no deseadas (Pat. de EE.UU. Nº 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por el VIH (Publicación PCT nº WO 91/00360 y WO 92/200373 EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden hacerse utilizando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes y técnicas de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Pat. de EE.UU. Nº 4.676.980.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* utilizando procedimientos conocidos de química de proteínas sintéticas, incluidos los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Algunos ejemplos de reactivos adecuados para este fin son el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato.

En los anticuerpos humanizados recombinantes, la porción Fcγ puede ser modificada para evitar la interacción con el receptor Fcγ y los sistemas de complemento e inmunológico. Las técnicas para la preparación de dichos anticuerpos se describen en WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante puede diseñarse para que se parezca más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria si el anticuerpo se utiliza en ensayos clínicos y tratamientos en humanos. Véase, por ejemplo, la Pat. de los EE.UU. Números 5.997.867 y 5.866.692.

Las modificaciones de los anticuerpos y polipéptidos descritas en el presente documento, incluidos los anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y las variantes que tienen una actividad y/o afinidad mejorada o disminuida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada a BCMA y/o CD3. La modificación de los polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no es necesario describirla en detalle en este documento. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente la actividad funcional, o que maduran (mejoran) la afinidad del polipéptido por su ligando, o el uso de análogos químicos.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasequencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una etiqueta epitópica. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de la FR. Las sustituciones conservadoras figuran en la Tabla 5 bajo el epígrafe "sustituciones conservadoras" Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 5, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos pueden ser examinados.

Tabla 5: Sustituciones de aminoácidos

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

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la espina dorsal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos de aminoácidos presentes en la naturaleza se dividen en grupos basados en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) No polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) Polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) Ácido (con carga negativa): Asp, Glu;

(4) Básico (con carga positiva): Lys, Arg;

(5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

(6) Aromático: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se realizan intercambiando un miembro de una de estas clases por otro.

Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo también puede ser sustituido, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, especialmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden ir desde el cambio o la modificación de uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad de unión y/o la especificidad. En algunos casos, no se realizan más de una a cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de un dominio CDR. En otros casos, no se realizan más de una a tres sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de un dominio CDR. En otros casos, el dominio CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, Chem. *Immunol.* 65:111-128, 1997; Wright y Morrison, TibTECH 15:26-32, 1997). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd et al., Mol. *Immunol.* 32:1311-1318, 1996 Wittwe y Howard, Biochem. 29:4175-4180, 1990) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína, que puede afectar a la conformación y a la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Jefferis y Lund, supra Wyss y Wagner, Current Opin. Biotecnología. 7, 525 a 1996). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una determinada glicoproteína a ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha informado de que la glicosilación de los anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó de que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisecante, han mejorado la actividad ADCC (Umana et al., Mature Biotech. 17, 525 a 1999).

La glicosilación de los anticuerpos está típicamente ligada a N o a O. El término "ligado a la N" se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptidas asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptidas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados al N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación ligados a O).

El patrón de glicosilación de los anticuerpos también puede ser alterado sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped utilizada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo de célula utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, los anticuerpos, como potenciales terapéuticos, rara vez es la célula nativa, cabe esperar variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo Hse et al., J. Biol. *Chem.* 272, 525 a 1997).

Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación de los medios, la densidad de cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto varios procedimientos para alterar el

patrón de glicosilación conseguido en un organismo huésped concreto, incluyendo la introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Pat. de EE.UU. Nº 5.047.335 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, pueden eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, utilizando endoglicosidasa H (Endo H), N-glicosidasa F, endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante puede ser modificada genéticamente para que sea defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas similares son bien conocidas en la técnica.

Otros procedimientos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en el arte, incluyendo, pero no limitado a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Las modificaciones pueden utilizarse, por ejemplo, para la fijación de etiquetas para el inmunoensayo. Los polipéptidos modificados se fabrican mediante procedimientos establecidos en la técnica y pueden ser examinados mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los Ejemplos.

En algunos casos de la divulgación, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que tiene afinidad aumentada a un receptor Fc gamma humano, es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo no desencadena la lisis mediada por complemento, no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), o no activa los macrófagos; o tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en uno o más de los siguientes aspectos: desencadenar la lisis mediada por complemento, estimular la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), o activar la microglía. Se pueden utilizar diferentes modificaciones de la región constante para conseguir un nivel y/o una combinación óptimos de funciones efectoras. Véase, por ejemplo, Morgan et al., Immunology 86:319-324, 1995 Lund et al., J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969, 1996 Idusogie et al., J. Immunology 164:4178-4184, 2000 Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989y Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998. En algunos casos, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; Solicitud PCT No PCT/GB99/01441 y/o Solicitud de patente del Reino Unido nº 9809951.8. En otros casos, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada humana IgG2 que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de la IgG2 de tipo salvaje). Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. En otras realizaciones, la región constante se aglutina para la glicosilación ligada al N. En algunos casos, la región constante se aglutina para la glicosilación ligada a N mediante la mutación del residuo de aminoácido glicosilado o de los residuos flanqueantes que forman parte de la secuencia de reconocimiento de la glicosilación N en la región constante. Por ejemplo, el sitio de N-glicosilación N297 puede mutar a A, Q, K o H. Ver, Tao et al., J. Immunology 143: 2595-2601, 1989 y Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76, 1998. En algunos casos, la región constante se aglutina para la glicosilación ligada al N. La región constante puede ser aglicosilada para la glicosilación ligada al N enzimáticamente (como la eliminación de carbohidratos por la enzima PNGasa), o por expresión en una célula huésped deficiente en glicosilación.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados como se describe en la Publicación PCT nº WO 99/58572. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a toda o parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis significativa dependiente del complemento, o la destrucción mediada por células de la diana. En casos, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Suelen basarse en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios C_H2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para su uso en la terapia crónica de anticuerpos, para evitar las reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia convencional de anticuerpos.

Los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783, 1992 Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813, 1994 Schier et al., Gene, 169:147-155, 1995 Yelton et al., J. Immunol., 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., J. Immunol., 154(7):3310-9, 1995, Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896, 1992 y Publicación PCT nº WO2004/058184).

Los siguientes procedimientos pueden utilizarse para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (por ejemplo, mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, como un anticuerpo, se denomina "mutagénesis de barrido de biblioteca". En general, la mutagénesis de barrido de biblioteca funciona de la siguiente manera. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se sustituyen por dos o más (como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) aminoácidos utilizando procedimientos reconocidos en el arte. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunos casos, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). Generalmente, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada biblioteca se examinan para ver la afinidad de unión al polipéptido objetivo (u otro objetivo de unión), y se identifican los candidatos con aumento, igual, disminución o sin unión. Los procedimientos para determinar la afinidad de unión son bien conocidos en la técnica. La afinidad de unión puede determinarse mediante el análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore™, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o más. Biacore™ es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con

una afinidad relativamente alta, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o inferior. El cribado mediante la resonancia de plasmón superficial Biacore™ se describe en los Ejemplos, en este documento.

La afinidad de unión puede determinarse mediante Kinexa Biocensor, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), temple de fluorescencia, transferencia de fluorescencia, y/o visualización de levadura. La afinidad de unión también se puede comprobar mediante un bioensayo adecuado.

En algunos casos, cada posición de aminoácido en una CDR se sustituye (en algunos casos, una a la vez) con los 20 aminoácidos naturales utilizando procedimientos de mutagénesis reconocidos en el arte (algunos de los cuales se describen en el presente documento). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunos casos, una por cada posición de aminoácido que se analice), cada una con una complejidad de 20 miembros (si se sustituyen los 20 aminoácidos en cada posición).

En algunos casos, la biblioteca que se va a examinar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDR. Así, la biblioteca puede incluir sustituciones en dos o más posiciones de una CDR. La biblioteca puede incluir la sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución en 3, 4, 5 o más posiciones, encontrándose dichas posiciones en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs. La sustitución puede prepararse utilizando codones de baja redundancia. Véase, por ejemplo, la tabla 2 de Balint et al., Gene 137(1):109-18, 1993.

La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede ser uno o más de las CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, y/o CDRH3. La CDR puede ser una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR ampliada.

Los candidatos con una unión mejorada pueden ser secuenciados, identificando así un mutante de sustitución de CDR que resulta en una afinidad mejorada (también denominada una sustitución "mejorada"). Los candidatos que se unen también pueden ser secuenciados, identificando así una sustitución de CDR que mantiene la unión.

Pueden realizarse múltiples rondas de cribado. Por ejemplo, los candidatos (cada uno de los cuales comprende una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contenga al menos el aminoácido original y el aminoácido sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, la posición de aminoácido en la CDR en la que un mutante de sustitución mostró una unión mejorada). La preparación y el cribado o la selección de esta biblioteca se analizan más adelante.

La mutagénesis de exploración de bibliotecas también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en la medida en que la frecuencia de clones con una unión mejorada, la misma unión, una unión disminuida o ninguna unión también proporciona información relativa a la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR retiene la unión cuando se cambian los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que probablemente no sea necesaria para la unión del antígeno. Por el contrario, si una posición de la CDR conserva la unión en sólo un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición importante para la función de la CDR. Así, los procedimientos de mutagénesis de exploración de bibliotecas generan información sobre las posiciones de las CDR que pueden cambiarse por muchos aminoácidos diferentes (incluidos los 20 aminoácidos), y las posiciones de las CDR que no pueden cambiarse o que sólo pueden cambiarse por unos pocos aminoácidos.

Los candidatos con afinidad mejorada pueden combinarse en una segunda biblioteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición, y puede incluir además sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se desee, o que se permita utilizando el procedimiento de cribado o selección deseado. Además, si se desea, la posición del aminoácido adyacente puede ser aleatoria para al menos dos o más aminoácidos. La aleatorización de aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, lo que a su vez puede permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. La biblioteca también puede incluir sustituciones en posiciones que no mostraron una mejor afinidad en la primera ronda de cribado.

La segunda biblioteca se cribará o seleccionará en busca de miembros de la biblioteca con afinidad de unión mejorada y/o alterada utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluido el cribado mediante el análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore™, y la selección mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la selección, incluido el despliegue de fagos, el despliegue de levaduras y el despliegue de ribosomas.

También se describen composiciones que comprenden anticuerpos conjugados (por ejemplo, enlazados) con un agente que facilita el acoplamiento a un soporte sólido (como biotina o avidina). Para simplificar, se hará referencia en general a los anticuerpos, entendiendo que estos procedimientos se aplican a cualquiera de los anticuerpos BCMA. La conjugación se refiere generalmente a la unión de estos componentes como se describe aquí. La vinculación (que generalmente es la fijación de estos componentes en asociación próxima, al menos para la administración) puede lograrse de cualquier manera. Por ejemplo, una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contenga carbonilo, como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contenga un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

En otro caso, se proporciona un procedimiento para hacer cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

También se proporcionan polinucleótidos complementarios a cualquiera de estas secuencias también están comprendidos en la presente divulgación. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNhn, que contienen intrones y se corresponden con una molécula de ADN de manera unívoca, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no es necesario, estar presentes dentro de un polinucleótido, y un polinucleótido puede, pero no es necesario, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción del mismo) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de manera que la inmunoreactividad del polipéptido codificado no disminuye, en relación con una molécula inmunoreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento. Las variantes exhiben preferentemente al menos aproximadamente 70% de identidad, más preferentemente, al menos aproximadamente 80% de identidad, aún más preferentemente, al menos aproximadamente 90% de identidad, y más preferentemente, al menos aproximadamente 95% de identidad con una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo nativo o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para obtener la máxima correspondencia como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan normalmente comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75, o de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se hayan alineado de forma óptima.

El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede realizarse utilizando el programa Megalign de la suite de software bioinformático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando los parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence y Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358 Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment y Phylogenes pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153 Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105 Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425 Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles y Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, brechas) del 20 por ciento o menos, generalmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen bases de ácido nucleico o residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia.

Las variantes pueden también, o alternativamente, ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o a una porción o complemento del mismo. Dichas variantes polinucleotídicas son capaces de hibridarse en condiciones moderadamente estrictas con una secuencia de ADN natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia de complementariedad).

Unas "condiciones moderadamente estrictas" adecuadas incluyen el prelavado en una solución de 5 X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); hibridación a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante toda la noche; seguida de dos lavados a 65°C durante 20 minutos con cada una de las soluciones 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contienen 0,1% SDS.

Tal y como se utiliza en el presente documento, las "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean una fuerza iónica baja y una temperatura alta para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/0,0015 M citrato de sodio/0,1% dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizador, como la formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampón fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 × SSC (0,75 M

NaCl, 0,075 M citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 × solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 × SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C, seguidos de un lavado de alta intensidad consistente en 0,1 × SSC con EDTA a 55°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores como la longitud de la sonda y similares.

Los expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como el descrito en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente. Además, se describen los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, aunque no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse mediante técnicas estándar (como la hibridación, la amplificación y/o la comparación de secuencias en bases de datos).

Los polinucleótidos pueden obtenerse mediante síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis química de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica y no es necesario describirlos en detalle en el presente documento. Un experto en la materia puede utilizar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos utilizando procedimientos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada puede insertarse en un vector adecuado, y el vector, a su vez, puede introducirse en una célula huésped adecuada para su replicación y amplificación, como se explica más adelante. Los polinucleótidos pueden insertarse en las células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido así amplificado puede aislarse de la célula huésped por procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989.

Alternativamente, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología PCR es bien conocida en la técnica y se describe en laPatente de EE.UU. Nros. 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202 así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

El ARN puede obtenerse utilizando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN se puede aislar utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, como se expone en Sambrook et al., 1989, supra, por ejemplo.

Los vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas estándar, o pueden seleccionarse de entre un gran número de vectores de clonación disponibles en el arte. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar en función de la célula huésped que se pretenda utilizar, los vectores de clonación útiles tendrán generalmente la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer una única diana para una endonucleasa de restricción particular, y/o pueden llevar genes para un marcador que pueda utilizarse en la selección de clones que contengan el vector. Algunos ejemplos adecuados son los plásmidos y los virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son constructos polinucleotídicos replicables que contienen un polinucleótido según la divulgación. Se da por supuesto que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped, ya sea como episomas o como parte integrante del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, entre otros, los plásmidos, los vectores virales, incluidos los adenovirus, los virus adeno-asociados, los retrovirus, los cósmidos y los vectores de expresión divulgados en la Publicación PCT nº WO 87/04462. Los componentes del vector generalmente pueden incluir, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcional adecuados (como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción), también suelen ser necesarios uno o más elementos de control de la traducción, como los sitios de unión a los ribosomas, los sitios de iniciación de la traducción y los codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de un número de medios apropiados, incluyendo la electroporación, la transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, u otras sustancias; el bombardeo de microproyectos; la lipofección; y la infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

También se describen células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Para aislar los genes que codifican el anticuerpo, el polipéptido o la proteína de interés, puede utilizarse cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo. Ejemplos no limitantes de células huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a las células COS, HeLa y CHO. Véase también la Publicación PCT nº WO 87/04462. Las células huésped no mamíferas adecuadas incluyen procariotas (como *E. coli* o *B. subtillis*) y levaduras (como *S. cerevisae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los cDNAs a un nivel aproximadamente 5 veces mayor, más preferentemente, 10 veces mayor, incluso más preferentemente, 20 veces mayor que el del correspondiente anticuerpo endógeno o proteína de interés, si está presente, en las células huésped. El cribado de las células huésped para una unión específica a BCMA o a un dominio BCMA (por ejemplo, los dominios 1-4) se realiza mediante un inmunoensayo o FACS. Se puede identificar una célula que sobreexprese el anticuerpo o la proteína de interés.

Procedimientos de uso de los anticuerpos biespecíficos [Aplicaciones terapéuticas]

Los anticuerpos de la presente divulgación son útiles en diversas aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos de tratamiento terapéutico y procedimientos de tratamiento diagnóstico.

En un caso, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos biespecíficos de la invención para su uso en el tratamiento de una afección (por ejemplo, cáncer o trastorno autoinmunitario) asociada con la expresión de BCMA en un sujeto que la necesita. En algunos casos, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA para su uso en la inhibición del crecimiento o la progresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan BCMA. En algunos casos, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA para su uso en la inhibición de la metástasis de células malignas que expresan BCMA en un sujeto que los necesita. En algunos casos, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA para su uso en la inducción de la regresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan BCMA.

En otro aspecto, la invención proporciona los anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA para su uso en el tratamiento de una afección (por ejemplo, cáncer o trastorno autoinmune) asociada con la expresión de BCMA en un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, se proporcionan los anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA para su uso en la inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan BCMA. En algunas realizaciones, se proporcionan los anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA para su uso en la inhibición de la metástasis de células malignas que expresan BCMA en un sujeto que los necesita. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA para su uso en la inducción de la regresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan BCMA.

Tal como se utiliza en el presente documento, el cáncer puede ser un cáncer relacionado con las células B que incluye, entre otros, el mieloma múltiple, la neoplasia maligna de células plasmáticas, el linfoma de Hodgkin, el linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular, Enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma no Hodgkin de células B (LNH), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC),linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia mieloide, macroglobulienemia de Waldenstrom, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma del tejido linfático asociado a las mucosas, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma mediastínico primario (tímico) de células B grandes, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulienemia de Waldenstrom, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma primario de efusión, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma cutáneo primario difuso de células B grandes (tipo de pierna), linfoma difuso de células B grandes positivo para el VEB de los ancianos, linfoma difuso de células B grandes asociado a la inflamación, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de células B grandes ALK positivo, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada al HHV8, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico, y otros linfomas relacionados con las células B.

Tal como se utiliza en el presente documento, los trastornos autoinmunes incluyen, entre otros, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la diabetes (tipo I), la esclerosis múltiple, la enfermedad de Addison, la enfermedad celíaca, la dermatomiositis, la enfermedad de Graves, la tiroiditis de hashimoto, la encefalopatía de hashimoto, la miastenia gravis, la anemia perniciosa, la artritis reactiva, el síndrome de Sjogren encefalomielitis aguda diseminada, agammaglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome antisintetasa, alergia atópica, dermatitis atópica, enteropatía autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendorcrino autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, púrpura trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad de Bechet, enfermedad

de Castleman, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, fascitis eosinofílica, penfigoide gastrointestinal, síndrome de Goodpasture, Síndrome de Guillain-Barré, hidradenitis supurativa, púrpura trombocitopénica idiopática, narcolepsia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, policondritis recidivante, fiebre reumática, arteritis temporal, mielitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad indiferenciada del tejido conectivo, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

En otro caso, se proporciona un procedimiento para detectar, diagnosticar y/o monitorizar una condición asociada con la expresión de BCMA. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden marcarse con una fracción detectable, como un agente de imagen y una etiqueta de sustrato enzimático. Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden utilizarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*, como la obtención de imágenes *in vivo* (por ejemplo, PET o SPECT), o un reactivo de tinción.

En algunas realizaciones, los procedimientos terapéuticos aquí descritos comprenden además un paso de tratamiento de un sujeto con una forma adicional de terapia. En algunas realizaciones, la forma adicional de terapia es una terapia adicional contra el cáncer que incluye, pero no se limita a, quimioterapia, radiación, cirugía, terapia hormonal y/o inmunoterapia adicional.

En algunas realizaciones, la forma adicional de terapia comprende la administración de uno o más agentes terapéuticos además de los anticuerpos CD3-BCMA biespecíficos. El uno o más agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico que incluye, pero no se limita a, un segundo anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (por ejemplo, AVASTIN®), un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, HERCEPTIN®), un anticuerpo anti-CD25, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN®), un anticuerpo antiglicoproteína similar a la mucina, un anticuerpo anti-TNF, y/o un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, ERBITUX®)), un inhibidor de la angiogénesis, un agente citotóxico (por ejemplo, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina y mitoxantrona), taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), dolastatina, duocarmicina, enedina, geldanamicina, maytansina, puromicina, alcaloide de la vinca (por ejemplo, vincristina), un inhibidor de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido), tubulisina, un análogo de la pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo), agentes que contienen platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, ciclofosfamida o carmustina) y hemiasterlina), agente inmunomodulador (por ejemplo, prednisona y lenalidomida (REVLIMID®)), un agente antiinflamatorio (por ejemplo, dexametasona), un inhibidor de la aromatasa (por ejemplo, anastrozol, exemestano, letrozol, vorozol, formestano o testolactona), un inhibidor del proteasoma (por ejemplo bortezomib como VELCADE® ([(1R)-3-metil-1-[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-[(pirazinilcarbonil)amino]propy- l]amino]butil] ácido borónico o carfilzomib), y otros agentes como el tamoxifeno.

Por ejemplo, en algunos casos, se proporciona un procedimiento terapéutico para tratar el mieloma múltiple que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende los anticuerpos CD3-BCMA biespecíficos y uno o más agentes terapéuticos tales como un agente quimioterapéutico (por ejemplo, doxorrubicina o carfilzomib) o talidomida o su derivado (por ejemplo, lenalidomida (REVLIMID®)). En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en bortezomib (por ejemplo, VELCADE®), melfalán, prednisona, doxorrubicina, lenalidomida, talidomida, prednisona, carmustina, etopósido, cisplatino, ciclofosfamida, carfilzomib y vincristina. En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico es bortezomib (por ejemplo, VELCADE®), melfalán, lenalidomida (REVLIMID®), carfilzomib, doxorrubicina o prednisona. En consecuencia, se proporciona un procedimiento para tratar el mieloma múltiple que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz de una composición que comprende los anticuerpos CD3-BCMA biespecíficos y uno o más agentes terapéuticos que se seleccionan del grupo que consiste en bortezomib, lenalidomida, carfilzomib y doxorrubicina. En algunas realizaciones, el paciente es recidivante o refractario a la terapia previa del mieloma múltiple.

Los anticuerpos CD3-BCMA biespecíficos pueden administrarse a un individuo por cualquier vía adecuada. Los expertos en la materia deben entender que los ejemplos descritos en el presente documento no pretenden ser limitativos, sino ilustrativos de las técnicas disponibles. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo CD3-BCMA biespecífico se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, como la administración intravenosa, por ejemplo como bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intracraneal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinovial, por insuflación, intratecal, oral, por inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, intravenosa, o localizada. Los nebulizadores disponibles en el mercado para formulaciones líquidas, incluidos los nebulizadores de chorro y los nebulizadores ultrasónicos, son útiles para su administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y el polvo liofilizado puede nebulizarse tras su reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo puede ser aerosolizado utilizando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalado como un polvo liofilizado y molido.

En un caso, el anticuerpo se administra a través de técnicas de administración local específica o dirigida. Entre los ejemplos de técnicas de administración local específica o dirigida se incluyen varias fuentes de depósito implantables del anticuerpo o catéteres de administración local, como catéteres de infusión, catéteres permanentes o catéteres de aguja, injertos sintéticos, envolturas adventicias, derivaciones y stents u otros dispositivos implantables, portadores

específicos del sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo la Publicación PCT nº WO 00/53211 y Pat. de EE.UU. Nº 5.981.568.

Se pueden utilizar diversas formulaciones del anticuerpo para su administración. En algunos casos, el anticuerpo puede administrarse puro. En algunas realizaciones, el anticuerp y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en varias formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, entre otros, agentes estabilizadores, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones y potenciadores de la penetración en la piel. Los excipientes, así como las formulaciones para la administración de medicamentos parenterales y no parenterales, se exponen en Remington, The Science y Practice of Pharmacy 21st Ed. Editorial Mack, 2005.

En algunas realizaciones, estos agentes están formulados para su administración por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En consecuencia, estos agentes pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables, como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación concreto, es decir, la dosis, el momento y la repetición, dependerá de cada persona y de su historial médico.

Los anticuerpos CD3-BCMA biespecíficos pueden administrarse mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo por inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). El anticuerpo también puede administrarse por inhalación, como se describe en el presente documento. Generalmente, para la administración de un anticuerpo una dosis inicial candidata puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Una dosis diaria típica puede oscilar entre 3 µg/kg y 30 µg/kg y 300 µg/kg y 3 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, pueden utilizarse dosis de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para inhibir o retrasar el crecimiento/progresión del tumor o la metástasis de las células cancerosas. Un régimen de dosificación ejemplar comprende la administración de una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo o del conjugado de anticuerpos BCMA, o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Otro régimen de dosificación ejemplar comprende la administración de dosis crecientes (por ejemplo, dosis inicial de 1 mg/kg y aumento gradual a una o más dosis más altas cada semana o período de tiempo más largo). También pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de decaimiento farmacocinético que el profesional desee lograr. Por ejemplo, en algunos casos, se contempla la dosificación de una a cuatro veces por semana. En otros casos, se contempla la dosificación una vez al mes o una vez cada dos meses o cada tres meses. El progreso de esta terapia se puede controlar fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el anticuerpo puede variar con el tiempo.

Lla dosis adecuada de un anticuerpo CD3-BCMA biespecíficodependerá del anticuerpo empleado, el tipo y la gravedad de los síntomas a tratar, si el agente se administra con fines terapéuticos, la terapia anterior, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente, la tasa de eliminación del paciente para el agente administrado, y la discreción del médico que lo atiende. Normalmente, el clínico administrará un anticuerpo hasta alcanzar una dosis que logre el resultado deseado. La dosis y/o la frecuencia pueden variar a lo largo del tratamiento. Las consideraciones empíricas, como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosis. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmunitario humano, como los anticuerpos humanizados o los anticuerpos totalmente humanos, pueden utilizarse para prolongar la semivida del anticuerpo y evitar que éste sea atacado por el sistema inmunitario del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse a lo largo de la terapia, y generalmente, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o la supresión y/o la mejora y/o el retraso de los síntomas, por ejemplo, la inhibición o el retraso del crecimiento del tumor, etc. Alternativamente, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación continua sostenida de anticuerpos. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

En un caso, las dosis de un anticuerpo CD3-BCMA biespecífico pueden determinarse empíricamente en individuos que han recibido una o más administraciones del anticuerpo. Los individuos reciben dosis incrementales de un anticuerpo . Para evaluar la eficacia, se puede seguir un indicador de la enfermedad.

La administración de un anticuerpo CD3-BCMA biespecífico de acuerdo con el procedimiento de la presente divulgación puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, de si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y de otros factores conocidos por los profesionales expertos. La administración de un anticuerpo CD3-BCMA biespecífico puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas.

En algunos casos, puede estar presente más de un anticuerpo CD3-BCMA biespecífico. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos diferentes o más CD3-BCMA biespecíficos. Generalmente, estos anticuerpos pueden tener actividades complementarias que no se afectan

mutuamente. Por ejemplo, pueden utilizarse uno o más de los siguientes anticuerpos: un primer anticuerpo BCMA o CD3 dirigido a un epítopo de BCMA o CD3 y un segundo anticuerpo BCMA o CD3 dirigido a un epítopo diferente de BCMA o CD3.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo CD3-BCMA biespecífico se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington, The Science y Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, y pueden comprender tampones como el fosfato, el citrato y otros ácidos orgánicos; sales como el cloruro de sodio; antioxidantes como el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio; el fenol, el alcohol butílico o el bencílico; los alquilparabenos, como el metil o el propilparabeno; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina de suero, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, como la glicina, la glutamina, la asparagina, la histidina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono como la glucosa, la manosa o las dextrinas; agentes quelantes como el EDTA; azúcares como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; contra-iones formadores de sal como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína).por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que contienen el anticuerpo CD3-BCMA se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, como los descritos en Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688, 1985 Hwang, et al., Proc. Acad. Nat. Sci. USA 77:4030, 1980 y Pat. de EE.UU. Números 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se divulgan en la Pat. de EE.UU. Nº 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado.

Los ingredientes activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington, The Science y Practice of Pharmacy 21st Ed. Editorial Mack, 2005.

Pueden prepararse preparados de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrófobos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se encuentran los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, el poli(2-hidroxietilmetacrilato), o el 'poli(vinilalcohol)'), los polilactidos (U.S. Pat. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se utilicen para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones de anticuerpos terapéuticos CD3-BCMA biespecíficos se colocan generalmente en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones pueden estar en formas de dosificación unitarias como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal, o administración por inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico, por ejemplo, ingredientes convencionales para la elaboración de comprimidos como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición sólida de preformulación que contenga una mezcla homogénea de un compuesto de la presente divulgación, o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del mismo. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el ingrediente activo se dispersa uniformemente en la composición, de modo que ésta puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces, como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición sólida de preformulación se subdivide entonces en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente divulgación. Los comprimidos o píldoras de la nueva composición pueden estar recubiertos o compuestos de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede

comprender un componente de dosificación interior y otro exterior, este último en forma de sobre sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase su liberación. Para dichas capas o recubrimientos entéricos pueden utilizarse diversos materiales, entre los que se incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como la goma laca, el alcohol cetílico y el acetato de celulosa.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, como los polioxietilenosorbitanos (por ejemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre el 0,05 y el 5% de agente tensioactivo, y pueden estar entre el 0,1 y el 2,5%. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si es necesario.

Las emulsiones adecuadas pueden prepararse utilizando emulsiones grasas disponibles en el mercado, como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El ingrediente activo puede disolverse en una composición de emulsión premezclada o, alternativamente, puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendras) y formarse una emulsión al mezclarse con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas suelen contener hasta un 20% de aceite, por ejemplo, entre un 5 y un 20%. La emulsión grasa puede comprender gotas de grasa de entre 0,1 y 1,0 µm, en particular de entre 0,1 y 0,5 µm, y tener un pH del orden de 5,5 a 8,0.

Las composiciones de emulsión pueden ser las que se preparan mezclando un anticuerpo CD3-BCMA biespecífico con Intralipid™ o sus componentes (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de ellos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados, como se ha indicado anteriormente. En algunos casos, las composiciones se administran por vía oral o respiratoria nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes preferentemente estériles y aceptables desde el punto de vista farmacéutico pueden nebulizarse mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede estar conectado a una máscara facial, una tienda de campaña o una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, en suspensión o en polvo pueden administrarse, preferentemente por vía oral o nasal, a partir de dispositivos que liberen la formulación de forma adecuada.

Composiciones

Las composiciones comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo CD3-BCMA biespecíficoEn una sección anterior y a continuación se describen ejemplos de tales composiciones, así como la forma de formularlas. En algunas realizaciones, la composición comprende uno o más anticuerpos CD3-BCMA. En algunos casos, el anticuerpo CD3-BCMA es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpoo CD3-BCMA comprende una región constante que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria deseada, como la lisis mediada por anticuerpos o la ADCC. En oteos casos, el anticuerpo BCMA o el anticuerpo CD3-BCMA comprende una región constante que no desencadena una respuesta inmunitaria no deseada o indeseable, como la lisis mediada por anticuerpos o la ADCC.

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un anticuerpo CD3-BCMA biespecífico (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos CD3-BCMA biespecíficos que reconocen diferentes epítopos de BCMA o CD3 y BCMA). Otras composiciones ejemplares comprenden más de un anticuerpo CD3-BCMA que reconocen el mismo epítopo(s), o diferentes especies de anticuerpos biespecíficos CD3-BCMA que se unen a diferentes epítopos de BCMA (por ejemplo, BCMA humano) o CD3 y BCMA (CD3 y BCMA humano).

La composiciónn puede comprender además portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science y practice of Pharmacy 21ª Ed., 2005, Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones, y pueden comprender tampones como el fosfato, el citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio; el fenol, el alcohol butílico o el bencílico; los alquilparabenos, como el metil o el propilparabeno; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol; y el m-cresol) polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina de suero, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, como la glicina, la glutamina, la asparagina, la histidina, la arginina o la lisina monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono como la glucosa, la manosa o los dextranos; agentes quelantes como el EDTA; azúcares como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; contra-iones formadores de sal como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína).por ejemplo, complejos de Zn-

proteína); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen además en el presente documento.

Kits

Los kits oueden incluir uno o más envases que comprenden el anticuerpo biespecífico CD3-BCMA y las instrucciones de uso para de acuerdo con cualqueira de los procedimientos descritos en el presente documento. En general, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo biespecífico CD3-CMA para los usos terapéuticos descritos anteriormente.

Las instrucciones relativas al uso de los anticuerpos CD3-BCMA biespecíficos descritos en el presente documento incluyen generalmente información sobre la dosis, el programa de dosificación y la vía de administración para el tratamiento previsto. Los envases pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes multidosis) o sub-dosis. Las instrucciones suministradas en los kits uelen ser instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, las instrucciones transportadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

Los kits se presentan en envases adecuados. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, bolsas de plástico o Mylar selladas), y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El contenedor también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo CD3-BCMA biespecífico. El recipiente puede contener además un segundo agente farmacéutico activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como topes e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a él.

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de la cinética y afinidad de las interacciones hBCMA/IGG humana a 25°C y/o 37°C

Este ejemplo determina la cinética y afinidad de varios anticuerpos anti-BCMA a 25°C y 37°C.

Todos los experimentos se realizaron en un biosensor de resonancia de Plasmón de superficie Proteon XPR36 de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Se preparó una matriz de anticuerpos anti-BCMA utilizando un procedimiento de acoplamiento de aminas en un GLC Sensor Chip de Bio-Rad similar al descrito en Abdiche, et al., Anal. *Biochem.* 411, 525 a 151). La temperatura de análisis para la inmovilización fue de 25°C y el tampón de funcionamiento fue HBS-T+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4). Los canales se activaron en la dirección del analito (horizontal) inyectando una mezcla de 1 mM de ECD y 0,25 mM de NHS durante 3 minutos a un flujo de 30 µl/min. Las lgGs se inmovilizaron en las manchas activadas inyectándolas en la dirección del ligando (vertical) a 20 µg/ml en tampón Acetato 10 mM pH 4,5 durante 1,5 minutos a 30 µg/ml. Las superficies activadas se bloquearon inyectando etanolamina 1M, pH 8,5 en la dirección del analito durante 3 minutos a 30 µl/min.

La temperatura de análisis para el análisis de unión de hBCMA fue de 37°C o 25°C en un tampón de funcionamiento de HBS-T+, complementado con 1 mg/ml de BSA. Se empleó un procedimiento de valoración cinética para el análisis de la interacción, tal como se describe en Abdiche, et al. El analito hBCMA (BCMA humano) se inyectó en la dirección del analito utilizando una serie de inyecciones de baja a alta concentración. Las concentraciones utilizadas fueron 0,08 nM, 0,4 nM, 2 nM, 10 nM y 50 nM (una serie de 5 miembros, con un factor de dilución de 5 veces y una concentración máxima de 50 nM). El tiempo de asociación para una determinada dilución del analito fue de dos minutos. Inmediatamente después de la inyección de 50 nM de hBCMA, se monitorizó la disociación durante 2 horas. Antes de las inyecciones de analito hBCMA, se inyectó tampón 5 veces utilizando los mismos tiempos de asociación y disociación en los ciclos de analito hBCMA para preparar un sensorgrama en blanco de tampón con fines de doble referencia (doble referencia como se describe en Myszka, J. Mol. Reconocer. 12, 525 a 284).

Los sensorgramas fueron doblemente referenciados y ajustados a un modelo de titulación cinética de *Langmuir con transporte de masa 1:1* en el software BIAevaluation versión 4,1,1 (GE Lifesciences, Piscataway, NJ). Los sensorgramas y los ajustes se muestran en la Figura 1, y la cinética y los parámetros de afinidad para varios anticuerpos anti-BCMA se muestran en las Tablas 6A-6C.

Tabla 6A

Muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	t1/2 (min)	K_D (pM)
A02_Rd4_6nM_C01	1,2E+06	2,8E-05	411	24
A02_Rd4_6nM_C16	1,1E+06	6,2E-05	187	59
Combo_Rd4_0,6nM_C29	6,6E+06	1,4E-04	83	21
L3PY/H3TAQ	2,6E+06	1,4E-04	84	53

Tabla 6B

Anticuerpo	ka (1/Ms) huBCMA @ 25°C	kd (1/s) huBCMA @25°C	T ½ (min) a huBCMA @25°C	KD (nM) a huBCMA @ 25°C
P6E01/P6E01	1,04E+06	4,15E-03	2,8	4,0
P6E01/H3.AQ	8,35E+05	3,45E-04	33,53	0,41
L1.LGF/L3.KW/P6E01	8,31E+05	7,55E-03	1,53	9,08
L1.LGF/L3.NY/P6E01	1,33E+06	4,40E-03	2,63	3,32
L1.GDF/L3.NY/P6E01	1,60E+06	5,92E-03	1,95	3,70
L1.LGF/L3.KW/H3.AL	4,28E+05	1,23E-03	9,40	2,87
L1.LGF/L3.KW/H3.AP	9,28E+05	2,27E-03	5,10	2,44
L1.LGF/L3.KW/H3.AQ	5,24E+05	9,56E-04	12,09	1,82
L1.LGF/L3.PY/H3.AP	4,57E+05	9,69E-04	11,92	2,12
L1.LGF/L3.PY/H3.AQ	9,31E+05	8,86E-04	13,04	0,95
L1.LGF/L3.NY/H3.AL	7,63E+05	9,70E-04	11,91	1,27
L1.LGF/L3.NY/H3.AP	9,36E+05	5,33E-04	21,67	0,57
L1.LGF/L3.NY/H3.AQ	6,66E+05	2,99E-04	38,61	0,45
L1.GDF/L3.KW/H3.AL	4,45E+05	3,90E-03	2,96	8,76
L1.GDF/L3.KW/H3.AP	1,17E+06	4,61E-03	2,51	3,93
L1.GDF/L3.KW/H3.AQ	7,97E+05	3,48E-03	3,32	4,37
L1.GDF/L3.PY/H3.AQ	1,42E+06	1,35E-02	0,86	9,49
L1.GDF/L3.NY/H3.AL	9,07E+05	4,03E-03	2,87	4,44
L1.GDF/L3.NY/H3.AP	1,41E+06	1,41E-03	8,21	1,00
L1.GDF/L3.NY/H3.AQ	9,84E+05	7,22E-04	16,00	0,73
L3.KW/P6E01	7,40E+05	3,15E-04	36,66	0,43
L3.PY/P6E01	7,12E+05	2,28E-04	50,74	0,32
L3.NY/P6E01	8,76E+05	3,84E-04	30,08	0,44
Anticuerpo	**ka (1/Ms) huBCMA @ 37°C**	**kd (1/s) huBCMA @37°C**	**T ½ (min) a huBCMA @37°C**	**KD (nM) a huBCMA @ 37°C**
L3.PY/L1.PS/P6E01	2,49E+06	1,13E-03	10,21	0,45
L3.PY/L1.AH/P6E01	2,55E+06	1,26E-03	9,19	0,49
L3.PY/L1.FF/P6E01	2,39E+06	1,41E-03	8,18	0,59

L3.PY/L1.PH/P6E01	2,81E+06	9,13E-04	12,65	0,32
L3.PY/L3.KY/P6E01	3,18E+06	1,09E-03	10,65	0,34
L3.PY/L3.KF/P6E01	2,88E+06	2,08E-03	5,56	0,72
L3.PY/H2.QR	2,56E+06	1,19E-03	9,75	0,46
L3.PY/H2.DY	2,60E+06	1,38E-03	8,37	0,53
L3.PY/H2.YQ	2,58E+06	1,56E-03	7,41	0,60
L3.PY/H2.LT	2,40E+06	1,29E-03	8,95	0,54
L3.PY/H2.HA	2,43E+06	1,47E-03	7,89	0,60
L3.PY/H2.QL	2,64E+06	2,18E-03	5,31	0,82
L3.PY/H3.YA	3,15E+06	1,18E-03	9,82	0,37
L3.PY/H3.AE	3,29E+06	1,39E-03	8,32	0,42
L3.PY/H3.AQ	3,08E+06	1,73E-03	6,69	0,56
L3.PY/H3.TAQ	3,08E+06	1,14E-03	10,13	0,37
L3.PY/P6E01	2,65E+06	1,96E-03	5,91	0,74
L3.PY/L1.PS/H2.QR	3,97E+06	1,03E-01	0,11	25,85
L3.PY/L1.PS/H2.DY	3,22E+06	3,61E-03	3,20	1,12
L3.PY/L1.PS/H2.YQ	3,35E+06	4,30E-03	2,69	1,28
L3.PV /L1.PS/H2.LT	3,40E+06	4,65E-03	2,49	1,37
L3.PY/L1.PS/H2.HA	3,30E+06	1,06E-02	1,09	3,21
L3.PY/L1.PS/H2.QL	1,52E+07	3,14E-01	0,04	20,64
L3.PY/L1.PS/H3.YA	3,07E+06	9,05E-03	1,28	2,95
L3.PY/L1.PS/H3.AE	3,14E+06	1,46E-03	7,93	0,46
L3.PY/L1.PS/H3.AQ	3,26E+06	1,79E-03	6,46	0,55
L3.PY/L1.PS/H3.TAQ	3,25E+06	2,46E-03	4,70	0,76
L3.PY/L1.AH/H2.QR	3,13E+06	1,81E-03	6,39	0,58
L3.PY/L1.AH/H2.DY	3,05E+06	1,52E-03	7,62	0,50
L3.PY/L1.AH/H2.YQ	2,42E+06	1,93E-03	6,00	0,80
L3.PY/L1.AH/H2.LT	3,16E+06	1,23E-03	9,38	0,39
L3.PY/L1.AH/H2.HA	3,33E+06	1,81E-03	6,37	0,54
Anticuerpo	**ka (1/Ms) cyBCMA @ 25°C**	**kd (1/s) cyBCMA @25°C**	**T ½ (min) a cyBCMA @25°C**	**KD (nM) a cyBCMA @ 25°C**
L3.PY/L1.AH/H2.QL	3,04E+06	1,60E-03	7,22	0,53
L3.PY/L1.AH/H3.YA	3,00E+06	1,50E-03	7,73	0,50
L3.PY/L1.AH/H3.AE	3,32E+06	1,73E-03	6,70	0,52
L3.PY/L1.AH/H3.AQ	3,03E+06	1,97E-03	5,85	0,65
L3.PY/L1.AH/H3.TAQ	3,27E+06	1,19E-03	9,68	0,37
L3.PY/L1.FF/H2.QR	3,47E+06	1,77E-03	6,54	0,51
L3.PY/L1.FF/H2.DY	4,14E+06	2,71E-03	4,27	0,65
L3.PY/L1.FF/H2.YQ	3,32E+06	1,52E-03	7,61	0,46

L3.PV /L1.FF/H2.LT	3,30E+06	1,67E-03	6,92	0,51
L3.PY/L1.FF/H2.HA	3,49E+06	2,19E-03	5,29	0,63
L3.PY/L1.FF/H2.QL	3,48E+06	1,40E-03	8,28	0,40
L3.PY/L1.FF/H3.YA	3,50E+06	1,80E-03	6,41	0,51
L3.PY/L1.FF/H3.AE	3,82E+06	2,63E-03	4,39	0,69
L3.PY/L1.FF/H3.AQ	3,32E+06	1,54E-03	7,51	0,46
L3.PY/L1.FF/H3.TAQ	3,52E+06	1,89E-03	6,12	0,54
L3.PY/L1.PH/H2.QR	3,69E+06	2,36E-03	4,89	0,64
L3.PY/L1.PH/H2.HA	2,37E+06	1,16E-03	9,99	0,49
L3.PY/L1.PH/H3.AE	3,68E+06	1,34E-03	8,61	0,36
L3.PY/L1.PH/H3.AQ	3,08E+06	1,59E-03	7,27	0,52
L3.PY/L1.PH/H3.TAQ	3,58E+06	2,13E-03	5,43	0,59
L3.PY/L3.KY/H2.QR	2,95E+06	9,90E-04	11,67	0,34
L3.PY/L3.KY/H2.DY	3,19E+06	6,42E-04	18,00	0,20
L3.PY/L3.KY/H2.YQ	2,14E+06	1,65E-03	7,02	0,77
L3.PY/L3.KY/H2.LT	2,92E+06	9,06E-04	12,75	0,31
L3.PV /L3.KV /H2.HA	3,29E+06	1,63E-03	7,10	0,49
L3.PY/L3.KY/H2.QL	3,65E+06	2,08E-03	5,56	0,57
L3.PY/L3.KY/H3.YA	3,30E+06	9,12E-04	12,67	0,28
L3.PY/L3.KY/H3.TAQ	2,79E+06	6,49E-04	17,79	0,23
L3.PY/L3.KF/H2.DY	2,74E+06	1,82E-03	6,35	0,67
L3.PY/L3.KF/H2.YQ	1,96E+06	2,23E-03	5,18	1,14
L3.PY/L3.KF/H2.LT	2,75E+06	1,91E-03	6,05	0,69
L3.PY/L3.KF/H2.QL	2,07E+06	1,25E-03	9,26	0,60
L3.PY/L3.KF/H3.YA	3,12E+06	1,47E-03	7,85	0,47
L3.PY/L3.KF/H3.AE	3,07E+06	1,55E-03	7,44	0,51
L3.PY/L3.KF/H3.AQ	3,48E+06	2,27E-03	5,09	0,65
L3.PY/L3.KF/H3.TAQ	2,82E+06	1,62E-03	7,12	0,58
Anticuerpo	**ka (1/Ms) cyBCMA @ 25°C**	**kd (1/s) cyBCMA @25°C**	**T ½ (min) a cyBCMA @25°C**	**KD (nM) a cyBCMA @ 25°C**
P6E01/P6E01		7,02E-02	0,16	115,4
P6E01/H3.AQ	1,08E+06	7,40E-03	1,6	6,9
L1.LGF/L3.KW/P6E01	4,55E+05	1,95E-02	0,6	42,8
L1.LGF/L3.NY/P6E01	9,20E+05	1,05E-02	1,1	11,4
L1.GDF/L3.NY/P6E01	1,20E+06	7,67E-03	1,5	6,4
L1.LGF/L3.KW/H3.AL	2,90E+05	1,21E-02	1,0	41,8
L1.LGF/L3.KW/H3.AP	5,54E+05	1,54E-02	0,7	27,8
L1.LGF/L3.KW/H3.AQ	5,27E+05	3,55E-03	3,3	6,7
L1.LGF/L3.PY/H3.AP	3,64E+05	1,30E-02	0,9	35,8

L1.LGF/L3.PY/H3.AQ	1,00E+06	4,77E-03	2,4	4,8
L1.LGF/L3.NY/H3.AL	6,35E+05	1,48E-02	0,8	23,2
L1.LGF/L3.NY/H3.AP	8,30E+05	5,57E-03	2,1	6,7
L1.LGF/L3.NY/H3.AQ	7,51E+05	1,48E-03	7,8	2,0
L1.GDF/L3.KW/H3.AL	3,18E+05	1,80E-02	0,6	56,7
L1.GDF/L3.KW/H3.AP	8,14E+05	2,03E-02	0,6	24,9
L1.GDF/L3.KW/H3.AQ	8,02E+05	5,65E-03	2,0	7,0
L1.GDF/L3.PY/H3.AQ	1,55E+06	1,66E-02	0,7	10,7
L1.GDF/L3.NY/H3.AL	9,00E+05	2,19E-02	0,5	24,3
L1.GDF/L3.NY/H3.AP	1,36E+06	7,02E-03	1,6	5,2
L1.GDF/L3.NY/H3.AQ	1,18E+06	1,36E-03	8,5	1,2
L3.KW/P6E01	7,63E+05	2,57E-03	4,5	3,4
L3.PY/P6E01	8,55E+05	2,93E-03	3,9	3,4
L3.NY/P6E01	1,01E+06	2,87E-03	4,0	2,8
Anticuerpo	**ka (1/Ms) cyBCMA @ 37°C**	**kd (1/s) cyBCMA @37°C**	**T ½ (min) a cyBCMA @37°C**	**KD (nM) a cyBCMA @ 37°C**
L3.PY/L1.PS/P6E01	2,17E+06	6,06E-03	1,91	2,79
L3.PY/L1.AH/P6E01	2,16E+06	5,72E-03	2,02	2,65
L3.PY/L1.FF/P6E01	2,45E+06	5,91E-03	1,96	2,41
L3.PY/L1.PH/P6E01	2,17E+06	7,89E-03	1,46	3,63
L3.PY/L3.KY/P6E01	2,27E+06	5,02E-03	230	2,21
L3.PY/L3.KF/P6E01	2,39E+06	8,30E-03	1,39	3,48
L3.PY/H2.QR	2,18E+06	6,58E-03	1,76	3,02
L3.PY/H2.DY	2,24E+06	6,18E-03	1,87	2,76
L3.PY/H2.YQ	2,46E+06	6,21E-03	1,86	2,53
L3.PY/H2.LT	2,09E+06	7,57E-03	1,53	3,63
L3.PY/H2.HA	1,99E+06	7,55E-03	1,53	3,79
L3.PY/H2.QL	2,05E+06	1,26E-02	0,91	6,16
L3.PY/H3.YA	2,87E+06	5,40E-03	2,14	1,88
L3.PY/H3.AE	2,82E+06	5,04E-03	2,29	1,79
L3.PY/H3.AQ	2,77E+06	5,39E-03	2,14	1,94
L3.PY/H3.TAQ	2,57E+06	4,37E-03	2,64	1,70
L3.PY/P6E01	2,20E+06	1,31E-02	0,88	5,96
L3.PY/L1.PS/H2.QR	5,25E+05	6,70E-04	17,23	1,28
L3.PY/L1.PS/H2.DY	1,90E+06	3,78E-03	3,06	1,99
L3.PY/L1.PS/H2.YQ	2,00E+06	3,74E-03	3,09	1,87
L3.PV /L1.PS/H2.LT	2,17E+06	4,11E-03	2,81	1,89
L3.PY/L1.PS/H2.HA	1,45E+06	2,69E-03	430	1,86

L3.PY/L1.PS/H2.QL	6,57E+05	6,36E-04	18,17	0,97
L3.PY/L1.PS/H3.YA	1,77E+06	9,98E-03	1,16	5,65
L3.PY/L1.PS/H3.AE	2,46E+06	4,13E-03	2,80	1,68
L3.PY/L1.PS/H3.AQ	2,52E+06	4,33E-03	2,67	1,72
L3.PY/L1.PS/H3.TAQ	2,58E+06	5,52E-03	2,09	2,14
L3.PY/L1.AH/H2.QR	2,20E+06	4,91E-03	2,35	2,23
L3.PY/L1.AH/H2.DY	2,32E+06	4,51E-03	2,56	1,95
L3.PY/L1.AH/H2.YQ	1,58E+06	4,31E-03	2,68	2,74
L3.PY/L1.AH/H2.LT	2,19E+06	2,96E-03	3,91	1,35
L3.PY/L1.AH/H2.HA	2,58E+06	4,39E-03	2,63	1,70
L3.PY/L1.AH/H2.QL	2,62E+06	9,55E-03	1,21	3,65
L3.PY/L1.AH/H3.YA	2,37E+06	5,26E-03	2,20	2,22
L3.PY/L1.AH/H3.AE	2,25E+06	3,56E-03	3,25	1,58
L3.PY/L1.AH/H3.AQ	2,24E+06	3,99E-03	2,90	1,78
L3.PY/L1.AH/H3.TAQ	2,28E+06	3,02E-03	3,83	1,32
L3.PY/L1.FF/H2.QR	2,55E+06	4,21E-03	2,75	1,65
L3.PY/L1.FF/H2.DY	2,66E+06	5,00E-03	2,31	1,88
L3.PY/L1.FF/H2.YQ	2,19E+06	3,26E-03	3,55	1,49
L3.PV /L1.FF/H2.LT	2,19E+06	3,41E-03	3,38	1,56
L3.PV/L1.FF/H2.HA	2,33E+06	4,17E-03	2,77	1,79
L3.PY/L1.FF/H2.QL	2,36E+06	4,49E-03	2,57	1,91
L3.PY/L1.FF/H3.YA	2,46E+06	4,16E-03	2,77	1,69
L3.PY/L1.FF/H3.AE	2,85E+06	5,01E-03	2,31	1,76
L3.PY/L1.FF/H3.AQ	2,18E+06	3,29E-03	3,51	1,51
L3.PY/L1.FF/H3.TAQ	2,32E+06	3,76E-03	3,07	1,62
L3.PY/L1.PH/H2.QR	2,42E+06	4,36E-03	2,65	1,80
L3.PY/L1.PH/H2.HA	1,61E+06	5,53E-03	2,09	3,44
L3.PY/L1.PH/H3.AE	2,61E+06	2,02E-03	5,72	0,77
L3.PY/L1.PH/H3.AQ	2,28E+06	3,41E-03	3,39	1,50
L3.PY/L1.PH/H3.TAQ	2,51E+06	3,20E-03	3,61	1,28
L3.PY/L3.KY/H2.QR	2,05E+06	7,74E-03	1,49	3,78
L3.PY/L3.KY/H2.DY	1,96E+06	2,43E-03	4,75	1,24
L3.PY/L3.KY/H2.YQ	1,27E+06	2,58E-03	4,47	2,04
L3.PY/L3.KY/H2.LT	1,82E+06	2,32E-03	4,98	1,27
L3.PY/L3.KY/H2.HA	2,28E+06	3,18E-03	3,63	1,40
L3.PY/L3.KY/H2.QL	2,75E+06	4,09E-03	2,83	1,49
L3.PY/L3.KY/H3.YA	1,84E+06	4,28E-03	2,70	2,33
L3.PY/L3.KY/H3.TAQ	1,81E+06	1,92E-03	6,03	1,06
L3.PY/L3.KF/H2.DY	2,08E+06	3,68E-03	3,14	1,77

L3.PY/L3.KF/H2.YQ	1,41E+06	5,01E-03	230	3,55
L3.PY/L3.KF/H2.LT	1,91E+06	4,13E-03	2,80	2,16
L3.PY/L3.KF/H2.QL	1,42E+06	3,10E-03	3,73	2,18
L3.PY/L3.KF/H3.YA	2,10E+06	7,96E-03	1,45	3,78
L3.PY/L3.KF/H3.AE	1,85E+06	5,64E-03	2,05	3,05
L3.PY/L3.KF/H3.AQ	2,55E+06	2,38E-03	4,85	0,93
L3.PY/L3.KF/H3.TAQ	2,01E+06	1,91E-03	6,05	0,95

Tabla 6C*

	Humano			Cyno		
Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
P5A2_VHVL	6,96E+06	3,87E-02	5567	1,61E+06	1,64E-02	10230
A02_Rd4_0,6nM_C06	3,49E+06	7,37E-05	21	1,81E+06	1,05E-04	58
A02_Rd4_0,6nM_C09	5,50E+06	9,75E-05	18	2,13E+06	1,74E-04	82
A02_Rd4_6nM_C16	1,56E+06	1,41E-04	90	1,34E+06	1,58E-04	118
A02_Rd4_6nM_C03	1,69E+06	1,26E-04	75	1,17E+06	1,85E-04	158
A02_Rd4_6nM_C01	3,11E+06	9,20E-05	30	1,45E+06	5,83E-04	401
A02_Rd4_6nM_C26	4,26E+06	1,39E-04	33	2,21E+06	4,48E-04	203
A02_Rd4_6nM_C25	2,75E+06	1,80E-04	65	1,50E+06	3,30E-04	220
A02_Rd4_6nM_C22	3,38E+06	1,82E-04	54	1,84E+06	3,24E-04	176
A02_Rd4_6nM_C19	3,00E+06	1,48E-04	49	2,54E+06	6,61E-04	260
A02_Rd4_0,6nM_C03	4,27E+06	1,82E-04	43	2,12E+06	4,26E-04	201
A02_Rd4_6nM_C07	1,48E+06	1,89E-04	128	6,91E+05	7,86E-04	1138
A02_Rd4_6nM_C23	1,22E+07	2,55E-04	21	2,63E+06	4,14E-04	157
A02_Rd4_0,6nM_C18	4,73E+06	2,29E-04	48	3,24E+06	6,39E-04	197
A02_Rd4_6nM_C10	4,51E+06	3,15E-04	70	1,90E+06	8,98E-04	472
A02_Rd4_6nM_C05	3,10E+06	3,08E-04	99	1,36E+06	1,29E-03	950
A02_Rd4_0,6nM_C10	2,30E+06	2,96E-04	129	8,83E+05	1,63E-03	1842
A02_Rd4_6nM_C04	4,47E+06	6,03E-04	135	2,18E+06	8,31E-04	381
A02_Rd4_0,6nM_C26	7,26E+06	4,43E-04	61	2,71E+06	2,56E-03	941

(continuación)

	Humano			Cyno		
Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
A02_Rd4_0,6nM_C13	8,53E+06	5,66E-04	66	2,29E+06	1,28E-03	560
A02_Rd4_0,6nM_C01	4,74E+06	9,15E-04	193	2,39E+06	1,57E-03	655
A02_Rd4_6nM_C08	3,92E+06	7,38E-04	188	2,23E+06	1,13E-02	5072

P5C1_VHVL	1,16E+07	6,92E-02	5986	3,53E+06	5,38E-02	15231
C01_Rd4_6nM_C24	7,47E+06	3,48E-03	467	3,17E+06	8,91E-04	281
C01_Rd4_6nM_C26	1,50E+07	1,36E-03	90	4,75E+06	1,99E-03	419
C01_Rd4_6nM_C02	1,61E+07	1,44E-03	89	5,12E+06	2,18E-03	426
C01_Rd4_6nM_C10	1,31E+07	2,12E-03	162	4,44E+06	2,19E-03	493
C01_Rd4_0,6nM_C27	1,23E+07	3,74E-03	303	3,34E+06	2,85E-03	852
C01_Rd4_6nM_C20	6,02E+06	2,76E-03	459	3,60E+06	6,25E-03	1737
C01_Rd4_6nM_C12	1,21E+07	6,49E-03	535	4,51E+06	3,70E-03	820
C01_Rd4_0,6nM_C16	1,55E+07	6,30E-03	407	4,95E+06	4,64E-03	939
C01_Rd4_0,6nM_C09	1,51E+07	8,25E-03	545	5,28E+06	9,36E-03	1773
C01_Rd4_6nM_C09	1,58E+07	1,28E-02	811	3,73E+06	8,68E-03	2328
C01_Rd4_0,6nM_C03	1,55E+07	1,50E-02	964	4,72E+06	1,19E-02	2528
C01_Rd4_0,6nM_C06	1,82E+07	1,54E-02	847	6,22E+06	1,21E-02	1948
C01_Rd4_6nM_C04	2,33E+07	4,97E-02	2134	6,34E+06	3,27E-02	5156
COMBO_Rd4_0,6nM_C22	1,97E+06	7,15E-05	36	1,34E+06	6,66E-05	50
COMBO_Rd4_6nM_C21	1,17E+07	7,34E-05	6	3,17E+06	2,48E-04	78
COMBO_Rd4_6nM_C10	5,47E+06	9,72E-05	18	1,52E+06	1,60E-04	105
COMBO_Rd4_0,6nM_C04	1,07E+07	1,58E-04	15	3,52E+06	1,37E-04	39
COMBO_Rd4_6nM_C25	7,98E+06	1,13E-04	14	2,85E+06	2,26E-04	79
COMBO_Rd4_0,6nM_C21	1,34E+07	1,15E-04	9	3,63E+06	3,04E-04	84
COMBO_Rd4_6nM_C11	6,74E+06	1,24E-04	18	2,64E+06	4,12E-04	156
COMBO_Rd4_0,6nM_C20	7,65E+06	1,46E-04	19	3,09E+06	2,84E-04	92
COMBO_Rd4_6nM_C09	8,85E+06	1,43E-04	16	2,37E+06	3,18E-04	134
COMBO_Rd4_6nM_C08	8,99E+06	1,69E-04	19	3,06E+06	4,28E-04	140
COMBO_Rd4_0,6nM_C19	7,86E+06	1,55E-04	20	2,92E+06	9,79E-04	336
COMBO_Rd4_0,6nM_C02	8,57E+06	1,85E-04	22	3,01E+06	4,94E-04	164
COMBO_Rd4_0,6nM_C23	7,39E+06	2,10E-04	28	2,81E+06	5,31E-04	189
COMBO_Rd4_0,6nM_C29	1,47E+07	2,77E-04	19	4,00E+06	3,36E-04	84
COMBO_Rd4_0,6nM_C09	1,04E+07	3,19E-04	31	3,77E+06	3,46E-04	92
COMBO_Rd4_6nM_C12	1,38E+07	2,70E-04	20	3,29E+06	4,86E-04	148
COMBO_Rd4_0,6nM_C30	4,35E+06	2,82E-04	65	1,68E+06	8,08E-04	481
COMBO_Rd4_0,6nM_C14	8,66E+06	3,28E-04	38	3,48E+06	6,45E-04	185
COMBO_Rd4_6nM_C07	1,05E+07	3,71E-04	35	3,94E+06	9,34E-04	237
COMBO_Rd4_6nM_C02	1,05E+06	4,43E-04	422	7,95E+05	1,36E-03	1714

(continuación)

Anticuerpo	Humano			Cyno		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
COMBO_Rd4_0,6nM_C05	4,32E+06	4,97E-04	115	1,94E+06	1,72E-03	886
COMBO_Rd4_0,6nM_C17	8,68E+06	8,01E-04	92	3,06E+06	1,01E-03	330
COMBO_Rd4_6nM_C22	3,03E+06	7,75E-04	256	1,70E+06	1,65E-03	972
COMBO_Rd4_0,6nM_C11	5,11E+06	1,06E-03	207	2,20E+06	4,23E-03	1924
*El análisis de unión se realizó a 37°C.						

Ejemplo 2: Citometría de flujo de anticuerpos humanos anti-BCMA en células tumorales BCMA positivas

Este ejemplo demuestra la unión de células tumorales BCMA positivas por varios anticuerpos BCMA.

La unión de anti-hBCMA humano expresado en IgG2a de ratón se evaluó en células que expresan BCMA (KMS12BM, L363, MM1S y KMS12PE) mediante citometría de flujo. Se incubaron 250,000 células con 0,5 ug de anticuerpo en 100uL de tampón de unión (PBS (solución salina tamponada con fosfato) + 0,2% de BSA (albúmina de suero bovino)), seguido de la incubación con Alex Fluor 647 conjugado con IgG anti-ratón (Biolegend). La tabla 7 muestra la MFI (intensidad media de fluorescencia) en las células tumorales positivas a BCMA por varios anticuerpos BCMA (por ejemplo, Combo_Rd4_0,6nM_C29, A02_Rd4_6nM_C01, A02_Rd4_6nM_C16, y P6E01/H3TAQ)

Tabla 7

	sólo en el ámbito secundario	**Combo_Rd4_ 0,6nM_C29**	**A02_Rd4_ 6nM_C01**	**A02_Rd4_6**	**P6E01/ H3TAQ**
Línea celular	**IMF**				
KMS12PE BCMA	26	6114	5862	3094	6018
MM1S BCMA	22	2569	2539	1951	2715
L363 BCMA	22	1667	1176	789	1457
KMS12BM BCMA	22	583	580	421	634

Ejemplo 3: Citotoxicidad de los ADCs Anti-BCMA en células BCMA positivas

Este ejemplo ilustra la eficacia de los ADCs anti-BCMA en células BCMA positivas.

Los anticuerpos humanos anti-BCMA (L3.PY/P6E01, L3.PY/H3.TAQ, Combo_Rd4_0,6nM_C29, A02_Rd4_6nM_C01, y A02_Rd4_6nM_C16) se expresaron como subtipos de IgG1 humanos diseñados con etiquetas de transglutaminasa ("Q") que contienen glutamina (por ejemplo, LCQ05, H7c, N297A, N297Q, N297A/H7c, N297Q/LCQ05) para relaciones de anticuerpos (DAR) de 2, 4 y 6. TG17 corresponde a SEQ ID NO: 472 (LLQGPP); LCQ05 corresponden a SEQ ID NO: 474 (GGLLQGPP), H7c corresponden a SEQ ID NO: 454 (LLQG), respectivamente, y conjugados con AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101 (Acetil-Lisina-Valina-Citrulina-p-aminobenziloxicarbonilo), amino-PEG6-C2-Aur3377, o amino-PEG6-C2-Aur0131 como se indica en la Tabla 8. En un caso, las etiquetas de transglutaminasa pueden ser diseñadas en la cadena ligera, la cadena pesada o una combinación de cadenas ligeras y pesadas. En otro caso, la etiqueta de transglutaminasa (por ejemplo, Q) se diseña en el sitio del anticuerpo, como en la posición 297 de la IgG humana (esquema de numeración de la UE). Por ejemplo, el aminoácido de tipo salvaje asparagina (N) se sustituye por glutamina o alanina en la posición 297 del anticuerpo BCMA (N297Q o N297A). La conjugación del anticuerpo anti-BCMA con Aur0101, Aur3377 y Aur0131 se realizó mediante una reacción de transamidación catalizada por la transglutaminasa microbiana entre el anticuerpo anti-BCMA que lleva una etiqueta de glutamina o glutamina dirigida en el sitio específico (por ejemplo el extremo carboxilo o el extremo amino de la cadena pesada o de la cadena ligera,

la posición 297, o en otro sitio del anticuerpo) y un derivado de la carga útil que contiene amina (por ejemplo, MMAD, Aur0101, Aur3377 o Aur0131). En algunos casos, el aminoácido de tipo salvaje lisina en la posición 222, 340 o 370 (de acuerdo con el esquema de numeración de la UE) fue sustituido por el aminoácido arginina ("K222R", "K340R" o "K370R"). Por ejemplo, se descubrió que la sustitución K222R tenía el sorprendente efecto de dar lugar a un conjugado de anticuerpo y carga útil más homogéneo, una mejor reticulación intermolecular entre el anticuerpo y la carga útil, y/o una disminución significativa de la reticulación entre cadenas con la etiqueta de glutamina en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo.

En la reacción de transamidación, la glutamina del anticuerpo actuó como donante de acilo, y el compuesto que contiene amina actuó como aceptor de acilo (donante de amina). El anticuerpo anti-BCMA purificado en la concentración de 1 - 150 µM se incubó con un exceso de aceptor de acil de 5 - 100 molar, que oscilaba entre 5 µM - 15 mM, en presencia de 0,23 - 0,55% (p/v) de transglutaminasa de *Streptoverticillium mobaraense* (ACTIVA™, Ajinomoto, Japón) en 10 - 1000 mM de NaCl, y 25 mM de MES, HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico] o tampón Tris HCl a un intervalo de pH de 6,2 - 8,8. Las condiciones de reacción se ajustaron para cada uno de los derivados del aceptor de acilo, y la eficacia y especificidad óptimas se observaron normalmente para 33 µM de anticuerpo, 0,67 mM de derivado y 0,378% (p/v) de transglutaminasa en 75 mM de NaCl, 25 mM de Tris HCl, pH 8,5. Tras la incubación a 20-37 grados C durante 1-24 horas, el anticuerpo se purificó en resina de butil sefarosa de alto rendimiento (butil HP) (GE Healthcare, Waukesha, WI) utilizando procedimientos cromatográficos estándar conocidos por los expertos en la materia, como la cromatografía de interacción hidrófoba comercial de GE Healthcare.

Las células que expresan la diana (MM1.S, KMS12BM y L363) se sembraron entonces en placas de fondo transparente a 3000 células/pocillo. Las células se trataron con conjugados anticuerpo-fármaco diluidos en serie 4 veces por triplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® 96 (Promega, Madison WI) 96 horas después del tratamiento. La viabilidad celular relativa se determinó como porcentaje del control no tratado. La EC50 se calculó con el software Prism. La Tabla 8 muestra que todos los anticuerpos humanos anti-BCMA de la presente divulgación conjugados con el agente citotóxico 0101, 3377 y 0131 a través de etiquetas y enlazadores de transglutaminasa ejercen una potente actividad de destrucción celular en células que expresan BCMA.

Tabla 8

EC50		MM1.S LUCGFP (BCMA++)		KMS12BM LUCGFP		L363 LUCGFP	
Anticuerpo	DAR	nM	ug/ml	nM	ug/ml	nM	ug/ml
L3.PY/P6E01 N297Q/K222R AcLys vc0101	4	0,42	0,06	31,79	4,77	7,34	1,10
L3PY/H3.TAQ N297Q/K222R Aclys vc0101	4	0,12	0,02	3,94	0,59	0,60	0,09
A02_Rd4_6nM_C01 N297Q/K222R Aclys vc0101	3,91	0,26	0,04	18,67	2,80	2,53	0,38
A02_Rd4_6nM_C16 N297Q/K222R Aclys vc0101	3,92	0,80	0,12	38,73	5,81	9,68	1,45
Combo_Rd4_0,6nM_C2 9 LCQ05/K222R Aclys vc0101	2	0,13	0,02	10,91	1,64	1,67	0,25
Combo_Rd4_0,6nM_C2 9 N297Q/K222R Aclys vc0101	3,9	0,11	0,02	0,99	0,15	0,66	0,10
Combo_Rd4_0,6nM_C2 9 LCQ05/N297Q/K222R Aclys vc0101	5,98	0,34	0,05	1,19	0,18	1,05	0,16
Combo_Rd4_0,6nM_C2 9 H7c/N297A/K222R AmPEG6 Aur0131	3,81	0,23	0,03	0,85	0,13	0,81	0,12

EC50		MM1.S LUCGFP (BCMA++)		KMS12BM LUCGFP		L363 LUCGFP	
Anticuerpo	DAR	nM	ug/ml	nM	ug/ml	nM	ug/ml
Combo_Rd4_0,6nM_C2 9 H7c/N297A/K222R AmPEG6 Aur3377	3,88	0,30	0,05	5,01	0,75	1,36	0,20

Ejemplo 4: Los ADCs anti-BCMA inducen la regresión tumoral en un modelo ortotópico de mieloma múltiple

Este ejemplo ilustra la eficacia *in vivo* de los ADCs anti-BCMA en el modelo de mieloma múltiple ortotópico MM1S.

El estudio de eficacia *in vivo* de los BCMA ADCs se realizó con la línea celular de mieloma múltiple MM1.S que expresa luciferasa y GFP (Proteína Verde Fluorescente) en un modelo ortotópico. Se inyectaron diez millones de células MM1.S LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales hembra CB17/SCID de 6-8 semanas de edad. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200uL por animal a 15mg/ml), seguida de anestesia con isofluorano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI) permiten el seguimiento de la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y la luciferina se capturaron mediante imágenes utilizando un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantificaron como flujo total (fotones/seg) utilizando Living Image 4,4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Cuando el flujo total alcanzó una media de 1-3E6 para todos los animales, éstos fueron distribuidos aleatoriamente en grupos y se les administró una dosis única de un anticuerpo humano anti-BCMA conjugado con 1) LCQ05/K222R-vc0101 en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo y conjugados de control mediante una inyección en bolo en la vena de la cola. Los animales fueron dados de baja cuando mostraron parálisis de las extremidades posteriores, un punto final para los modelos ortotópicos de MM1.S. La Figura 2 muestra que una dosis única de 3mg/kg de varios ADCs anti-BCMA humanos inhibe la progresión del tumor en comparación con el control negativo (NNC), incluyendo P6E01/P6E01-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; P5A2_VHVL-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; P5C1_VHVL-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; P4G4-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101; y P1A11-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101.

Este estudio demuestra que el tratamiento con un BCMA-ADC inhibe la progresión del mieloma múltiple.

Ejemplo 5: Los ADCs anti-BCMA inducen la regresión e inhibición del tumor en un modelo ortotópico de mieloma múltiple

Este ejemplo también ilustra la eficacia *in vivo* de los ADCs anti-BCMA en los modelos de mieloma múltiple ortotópico MM1.S.

El estudio de eficacia in *vivo* de los BCMA ADCs se realizó con la línea celular de mieloma múltiple MM1.S que expresa luciferasa y GFP en un modelo ortotópico. Se inyectaron diez millones de células MM1.S LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales hembra CB17/SCID de 6-8 semanas de edad. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200uL por animal a 15mg/ml), seguida de anestesia con isofluorano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI) permiten el seguimiento de la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y la luciferina se capturaron mediante imágenes utilizando un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantificaron como flujo total (fotones/seg) utilizando Living Image 4,4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Cuando el flujo total alcanzó una media de 1-3E6 para todos los animales, éstos fueron distribuidos aleatoriamente en grupos; 1) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-3377, 2) N297Q/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, 3) LCQ05/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, 4) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, 5) N297Q/K222R/LCQ05-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, y 6) conjugado de control LCQ04/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur01. Se administró una dosis única de ADCs anti-BCMA humanos y del conjugado de control mediante una inyección en bolo en la vena de la cola. Los animales fueron dados de baja cuando mostraron parálisis de las extremidades posteriores, un punto final para el modelo ortotópico MM1.S. La figura 3 muestra que una dosis única del anticuerpo humano anti-BCMA L3.PY/P6E01 conjugado con 1) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131 y 2) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-3377 produjo una regresión tumoral. Una dosis única del anticuerpo humano anti-BCMA L3.PY/P6E01 conjugado con 1) N297Q/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, 2) LCQ05/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, y 3) N297Q/K222R/LCQ05-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101 dio lugar a la inhibición del tumor.

En consecuencia, este estudio demuestra que el tratamiento con un BCMA-ADC induce la regresión e inhibe la progresión del mieloma múltiple.

Ejemplo 6: Los ADCs anti-BCMA inducen la inhibición del tumor en un modelo ortotópico de mieloma múltiple

Este ejemplo también ilustra la eficacia *in vivo* de los ADCs anti-BCMA en los modelos de mieloma múltiple ortotópico KMS12BM

El estudio de eficacia *in vivo* de los BCMA ADCs se realizó con la línea celular de mieloma múltiple KMS12BM que expresa luciferasa y GFP en un modelo ortotópico. Animales hembra NSG de 6-8 semanas de edad fueron irradiados con 100cGy y 24 horas después de la irradiación, se inyectaron diez millones de células KMS12BM LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200uL por animal a 15mg/ml), seguida de anestesia con isofluorano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI) permiten el seguimiento de la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y la luciferina se capturan mediante imágenes utilizando un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantifican como flujo total (fotones/seg) utilizando Living Image 4,4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Cuando el flujo total alcanzó una media de 5E6 para todos los animales, éstos fueron distribuidos aleatoriamente en grupos; 1) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-3377, 2) N297Q/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur010, 3) LCQ05/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, 4) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, 5) N297Q/K222R/LCQ05-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, y 6) conjugado de control LCQ04/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur01. Se administró una dosis única de ADCs anti-BCMA humanos y del conjugado de control mediante una inyección en bolo en la vena de la cola. Los animales fueron dados de baja cuando perdieron más del 15% del peso corporal total, un punto final para los modelos ortotópicos KMS12BM. La figura 4 muestra que una dosis única de anticuerpo humano anti-BCMA L3.PY/P6E01 conjugado con 1) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-3377, 2) N297Q/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, 3) LCQ05/K222R-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101, 4) H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, y 5) N297Q/K222R/LCQ05-AcLys-Val-Cit-PABC-Aur0101 dieron lugar a la inhibición del tumor.

En consecuencia, este estudio demuestra además que el tratamiento con un BCMA-ADC induce la regresión e inhibe la progresión del mieloma múltiple.

Ejemplo 7: Curva de respuesta a la dosis del ADC anti-BCMA en el modelo ortotópico MM1S

Este ejemplo ilustra además la eficacia *in vivo* de los ADCs anti-BCMA en los modelos de mieloma múltiple ortotópico MM1S

El estudio de eficacia in *vivo* de los BCMA ADCs se realizó con la línea celular de mieloma múltiple MM1.S que expresa luciferasa y GFP en un modelo ortotópico. Se inyectaron diez millones de células MM1.S LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales hembra CB17/SCID de 6-8 semanas de edad. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200uL por animal a 15mg/ml), seguida de anestesia con isofluorano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI) permiten el seguimiento de la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y la luciferina se capturaron mediante imágenes utilizando un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantificaron como flujo total (fotones/seg) utilizando Living Image 4,4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Cuando el flujo total alcanzó una media de 1,2E6 para todos los animales, éstos fueron distribuidos aleatoriamente en grupos: 1) 0,1 mg/kg de H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, 2) 038mg/kg de H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, 3) 0,75 mg/kg de H7c/N297A/K222-amino-PEG6-C2-0131, 4) 1,5mg/kg de H7c/N297A/K222R-amino-PEG6-C2-0131, y 5) 3 mg/kg de conjugado de control N297Q/K222R-AcLys-VC-0101. Se administró una dosis única de ADCs anti-BCMA humanos y del conjugado de control mediante una inyección en bolo en la vena de la cola. Los animales fueron dados de baja cuando mostraron parálisis de las extremidades posteriores, un punto final para el modelo ortotópico MM1.S. La figura 5 muestra que una dosis única del anticuerpo humano anti-BCMA COMBO_Rd4_0,6nM_C29 conjugado con los grupos 1)-4) anteriores dio lugar a la regresión del tumor a partir de 0,1mg/kg y a la inhibición del tumor hasta 100 días a partir de 0,75 mg/kg.

En consecuencia, este estudio demuestra que el tratamiento con un BCMA-ADC induce la regresión del tumor y la inhibición del mismo en el mieloma múltiple.

Ejemplo 8: Generación y purificación de anticuerpos heterodiméricos

Este ejemplo describe la generación y purificación de los anticuerpos heterodiméricos de la presente solicitud.

La región variable del anticuerpo humano específico anti-CD3 se clonó en una IgG1 o IgG2ΔA humana que contenía las siguientes mutaciones 221R, 228R y K409R; o 223R, 225R, 228R y K409R, respectivamente, y se denominó hIgG1 RRR o IgG2ΔA-RRR.

La región variable del anticuerpo antiobjetivo se clonó en una IgG1 o IgG2ΔA humana que contenía las siguientes mutaciones 221E, 228E, L368E o 223E, 225E, 228E y L368E, respectivamente, y se denominó hIgG1EEE o hIgG2ΔA-EEEE.

Los heterodímeros se prepararon incubando la IgG1 o IgG2ΔA anti-CD3 con mutaciones hIgG1 RRR o IgG2ΔA-RRR con un anticuerpo antiobjetivo con mutaciones hIgG1EEE o hIgG2ΔA-EEEE en PBS con 1 mM o 2 mM de GSH durante 24 horas a 37°C, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional No PCT/US2011/036419

(WO2011/143545). El heterodímero se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, como se describe a continuación.

Todos los heterodímeros se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico. Brevemente, la separación analítica por intercambio iónico de los Fc-hetero y Fc-homodímeros se llevó a cabo en el sistema LC de bomba cuaternaria Agilent 1100 (Agilent Inc, Santa Clara, CA, USA) equipado con una columna de intercambio catiónico débil DIONEX Propac WCX-10G (4x50mm). Las proteínas se inyectaron en un 5% de tampón A (20 mM MES pH 5,4) y se eluyeron en un gradiente del 25% al 75% de tampón B (20 mM MES pH 5,4 y 500 mM de NaCl) durante un periodo de 20 minutos con un flujo de 1ml/min. La purificación del heterodímero Fc a mayor escala se realizó en un Akta Explorer (GE) equipado con una columna de intercambio catiónico débil DIONEX Propac WCX-10G (4x250mm). Las proteínas se inyectaron en un 5% de tampón A (20 mM MES pH 5,4) y se eluyeron en un gradiente del 15% al 75% de tampón B (20 mM MES pH 5,4 y 500 mM de NaCl) durante un periodo de 60 minutos con un flujo de 1ml/min.

Ejemplo 9: Determinación de la cinética y la afinidad de las interacciones hCD3/IgG humana a 25°C y/o 37°C

Este ejemplo determina la cinética y afinidad de varios anticuerpos anti-CD3 a 25°C y 37°C.

Todos los experimentos se realizaron en un biosensor de resonancia de Plasmón de superficie Proteon XPR36 de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Se preparó una matriz de anticuerpos anti-CD3 utilizando un procedimiento de acoplamiento de aminas en un GLC Sensor Chip de Bio-Rad similar al descrito en Abdiche, et al., Anal. *Biochem.* 411, 525 a 151). La temperatura de análisis para la inmovilización fue de 25°C y el tampón de funcionamiento fue HBS-T+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4). Los canales se activaron en la dirección del analito (horizontal) inyectando una mezcla de 1 mM de ECD y 0,25 mM de NHS durante 3 minutos a un flujo de 30 µl/min. Las IgGs se inmovilizaron en las manchas activadas inyectándolas en la dirección del ligando (vertical) a 20 µg/ml en tampón Acetato 10 mM pH 4,5 durante 1,5 minutos a 30 µg/ml. Las superficies activadas se bloquearon inyectando etanolamina 1M, pH 8,5 en la dirección del analito durante 3 minutos a 30 µl/min.

La temperatura de análisis para el análisis de unión de hCD3 fue de 37°C o 25°C en un tampón de funcionamiento de HBS-T+, complementado con 1 mg/ml de BSA. Se empleó un procedimiento de valoración cinética para el análisis de la interacción, tal como se describe en Abdiche, et al. El analito hCD3 (CD3 humano) se inyectó en la dirección del analito utilizando una serie de inyecciones de baja a alta concentración. Las concentraciones utilizadas fueron 0,08 nM, 0,4 nM, 2 nM, 10 nM y 50 nM (una serie de 5 miembros, con un factor de dilución de 5 veces y una concentración máxima de 50 nM). El tiempo de asociación para una determinada dilución del analito fue de dos minutos. Inmediatamente después de la inyección de 50 nM de hCD3, se monitorizó la disociación durante 2 horas. Antes de las inyecciones del analito hCD3, se inyectó tampón 5 veces utilizando los mismos tiempos de asociación y disociación en los ciclos del analito hCD3 para preparar un sensorgrama en blanco de tampón con fines de doble referencia (la doble referencia se describe en Myszka, J. Mol. Recognit. 12, 279-284 (1999).

Los sensorgramas fueron doblemente referenciados y ajustados a un modelo de titulación cinética de *Langmuir con transporte de masa 1:1* en el software BIAevaluation versión 4,1,1 (GE Lifesciences, Piscataway, NJ). Los parámetros de cinética y afinidad para varios anticuerpos anti-CD3 se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Anticuerpo	**k_a (1/Ms) huCD3ed @25°C**	**k_d (1/s) huCD3ed @25°C**	**T ½ (min) a huCD3ed @25°C**	**K_D (nM) a huCD3ed @25°C**
H2B4	3,7E+05	2,0E-03	5,8	5,3
Anticuerpo	**k_a (1/Ms) huCD3ed @37°C**	**k_d (1/s) huCD3ed @37°C**	**T ½ (min) a huCD3ed @37°C**	**K_D (nM) a huCD3ed @37°C**
H2B4	4,37E+05	0,01369	0,84	314E-08
h2B4-VH-wt VL_TK	3,80E+05	1,40E-02	0,83	3,80E-08
h2B4-VH-Hnps VL_TK	3,90E+05	1,60E-02	0,72	4,10E-08
h2B4-VH-yads VL_TK	2,40E+05	2,10E-02	0,79	8,60E-08
h2B4-VH-yaes VL_TK	2,30E+05	2,30E-02	0,50	1,00E-07
h2B4-VH-yaps VL_TK	2,50E+05	2,30E-02	0,50	9,20E-08

Anticuerpo	k_a (1/Ms) huCD3ed @25°C	k_d (1/s) huCD3ed @25°C	T ½ (min) a huCD3ed @25°C	K_D (nM) a huCD3ed @25°C
Anticuerpo	**k_a (1/Ms) cyCD3ed @25°C**	**k_d (1/s) cyCD3ed @25°C**	**T ½ (min) a cyCD3ed @25°C**	**K_D (nM) a cyCD3ed @ 25°C**
H2B4	3,9E+05	1,5E-03	7,7	3,8

Ejemplo 10: Citometría de flujo de anticuerpos biespecíficos humanos anti-CD3 en células B y células T CD8+

Este ejemplo demuestra la eficacia de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3-anti-CD20 en células CD20+.

Los estudios con monos Cynomolgus se llevaron a cabo en los Laboratorios Charles River, Preclinical Services Nevada, de acuerdo con el Institutional Animal Care y Use Committee. Los animales (n=2) fueron dosificados mediante inyección intravenosa en bolo con el anticuerpo biespecífico anti-CD20/h2B4 en dosis de 500 ug/kg, 100 ug/kg, 20 ug/kg, 2 ug/kg, 0,2 ug/kg o 0,02 ug/kg. Los animales fueron observados dos veces al día y en cada punto de recogida de sangre. La sangre para la citometría de flujo y el análisis de citoquinas se recolectó en tubos de K2EDTA de un vaso periférico no utilizado para la dosificación i.v.

La eficacia se determinó midiendo las células B y T en la sangre periférica mediante citometría de flujo. Se recolectó sangre total en los momentos indicados y se conservó a 4° C hasta el análisis. Los eritrocitos se lisaron con el tampón ACK (Gibco) durante 5 minutos a temperatura ambiente y los glóbulos blancos se pelaron por centrifugación. Las células se tiñeron durante 1 hora a 4° C con un cóctel que contenía anticuerpos marcados con fluorescencia que reconocían cyno CD19 (Beckman Coulter), CD45, CD4, CD8, Ki67 (BD Biosciences) en PBS + 2% FBS. Para el análisis de Ki67, las células se tiñeron primero con CD4 y CD8, y luego se fijaron/permeabilizaron con el kit BD cyotfix/cytoperm (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante antes de la tinción intracelular para Ki67. La adquisición de células en un citómetro de flujo BD LSRII se realizó inmediatamente después de la tinción.

El recuento de células B resultante se graficó como un porcentaje del recuento de células B previo al estudio en las figuras 6A - 6F. La depleción prolongada de células B tras una dosis única se logró con dosis tan bajas como 2 ug/kg. Se observó una disminución de las células B en todas las dosis. La duración del efecto de agotamiento dependió de la dosis.

El recuento de células T CD8+ resultante se graficó como porcentaje del recuento de células T CD8+ previo al estudio en las figuras 7A - 7F. Tras una relocalización inicial, los niveles de células T se restablecieron a los niveles iniciales o superiores durante la duración del estudio.

Ejemplo 11: Citometría de flujo de anticuerpos biespecíficos humanos anti-CD3 en células T CD8+

Este ejemplo demuestra la eficacia del anticuerpo monovalente anti-CD3 en la cinética y activación de las células T.

Se realizaron estudios con monos Cynomolgus y se determinó la eficacia midiendo las células T en la sangre periférica mediante citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 3. Los monos Cynomolgus (n=2) fueron dosificados semanalmente, vía i.v., a razón de 0,2 ug/kg con anti-CD20/h2B4 o NNC (anticuerpo no específico)/ h2B4. En contraste con el anticuerpo biespecífico dirigido a CD20, el NNC/ h2B4 tiene poco o ningún efecto sobre la cinética de las células T CD8+ en la sangre, medida por citometría de flujo. El Ki67 se utilizó como marcador de la activación de las células T.

El recuento de células T resultante se graficó como porcentaje del recuento de células T CD8+ previo al estudio en las figuras 8A y 8B. En los monos cynomolgus a los que se les administró el anticuerpo biespecífico CD20/h2B4, las células T Ki67+ aumentaron y alcanzaron un máximo entre el día 3 y el día 7 después de la dosis, lo que indica una activación de las células T. Sin embargo, en los monos cynomolgus dosificados con NNC/ h2B4, no hubo un aumento de las células T Ki67+.

Ejemplo 12: Citometría de flujo de anticuerpos biespecíficos humanos anti-CD3 en células B

Este ejemplo demuestra el efecto de la afinidad del brazo anti-CD3 en la depleción de células B.

Se realizaron estudios con monos Cynomolgus y se determinó la eficacia midiendo las células T en la sangre periférica mediante citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 10. Los anticuerpos biespecíficos se hicieron con un brazo anti-CD20 emparejado con 4 brazos de anticuerpos anti-CD3 con diferentes afinidades. Tras una dosis única i.v. de 0,2 ug/kg, se determinó la eficacia midiendo las células B en sangre periférica mediante citometría de flujo.

En las Figuras 9A - 9D, el recuento de células B resultante se graficó como un porcentaje del recuento de células B previo al estudio. La eficacia de la depleción de células B se correlaciona con la afinidad del brazo anti-CD3.

Ejemplo 13: Estudio in *vitro* del anticuerpo biespecífico sobre la eliminación mediada por células T de las células BCMA positivas

Este ejemplo ilustra la citotoxicidad *in vitro* del *biespecífico Anti-BCMA/CD3hIgG2ΔA en células BCMA positivas.*

Los anticuerpos humanos anti-BCMA (P5A2, A02_Rd4_0,6nM_C01, A02_Rd4_6nM_C16, P5C1, C01_Rd4_6nM_C12, COMBO_Rd4_0,6nM_C22, Combo_Rd4_0,6nM_C29, L3PY/H3TAQ y A02_Rd4_6nM_C01) y los anticuerpos humanos anti-CD3 (H2B4) se expresaron como lgG2dA humanos diseñados con EEEE para el intercambio biespecífico como se describe en el Ejemplo 8.

Las células T CD3+ de PBMC fueron seleccionadas negativamente utilizando el kit de aislamiento de células T Pan, humanas (Miltenyi, San Diego CA). Las células que expresan la diana (KMS12PE, L363 y Molp8) y las células T CD3+ se sembraron en placas transparentes de fondo U a 20000 y 100000 células/pocillo respectivamente. Las células se trataron con anticuerpos biespecíficos diluidos en serie 10 veces por triplicado. La muerte celular se determinó mediante el ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96® (Promega, Madison WI) 20 horas después del tratamiento. La citotoxicidad de las células se determinó como porcentaje de los pocillos efectores no tratados más el control de la diana. La EC50 se calculó con el software Prism. La tabla 10 muestra que todos los anticuerpos biespecíficos humanos anti-BCMA_H2B4 ejercen una actividad de destrucción celular en las células que expresan BCMA.

Tabla 10

Anti-BCMA biespecífico	KMS12PE (BCMA+++)	KMS12BM BCMA(+)	MOLP8 (MOLP8+)
P5A2	0,371	1,509	5,231
A02 Rd4 0,6nM C01	0,073	0,078	0,550
A02_Rd4_6nM_C16	0,186	0,052	0,315
P5C1	0,581	4,117	N
C01_Rd4_6nM_C12	0,189	0,415	0,850
COMBO_Rd4_0,6nM_C22	0,115	0,049	0,065
Combo Rd4 0,6nM C29	0,175	0,049	0,201
L3PY/H3TAQ	0,070	0,055	0,337
A02 Rd4 6nM C01	UND	0,057	0,060

UND es indeterminado; N/A es que no se pudo determinar la EC50.

Ejemplo 14: Caracterización *in vitro* del anticuerpo anti-CD3 clonado de hibridoma de ratón

Este ejemplo ilustra la activación/proliferación de células T *in vitro* del anti-CD3 clonado a partir de un hibridoma de ratón en células PBMC humanas/cynomolgo para el cribado de anticuerpos.

Los anticuerpos humanos anti-CD3 se clonaron a partir de un ratón inmunizado, se expresaron como lgG1 de ratón y se purificaron mediante perlas de afinidad de proteína A. Las células mononucleares de sangre periférica humana/cinomolgo (hu/cyPBMC) se prepararon mediante Ficoll (Densidad: 1,083g/ml, GE) centrifugación en gradiente de densidad a partir de filtros de sangre obtenidos de bancos de sangre locales. Los eritrocitos se eliminaron incubando en tampón LCK (155 mM NH4Cl, 10 mM KHCO3, 100 mM EDTA; Gibco) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 600g. El sobrenadante que contenía los eritrocitos lisados se desechó y las PBMC se lavaron dos veces en 50 ml de 1×PBS/1% BSA/1mM EDTA. Las células dispersas se ajustaron a 10^7 células por ml en un medio de cultivo, X-VIVO-15, libre de suero (Lonza,), y las PBMC se sembraron como 10^6 (100ul) por pocillo en placas de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos. Los Abs seleccionados están diluidos en serie 10x de 1000ng a 1ng por ml para mezclar con PBMC humanas y diluidos en serie 5x de 5000ng a 200ng por ml

para mezclar con PBMC de cynomolgus. Para el análisis de la proliferación de células T de PBMC mediante la incorporación de ^{3}H-timidina, se realizaron cultivos de 2 días por triplicado. Durante las últimas 16 horas de cultivo se añadió ^{3}H-timidina (0,5 mCi/pocillo) y se midió la incorporación. Las células se recogen y lisan, el ADN se captura en un filtro de fibra de vidrio. Radioactividad (cpm) como medida de proliferación mediante recuento en un contador beta de centelleo.

Las Figuras 10A y 10B muestran que los anticuerpos anti-CD3 1A4, 1C10, 2B4 y 7A3 seleccionados tuvieron una lectura de incorporación de timidina en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas y de cinomolgo. La Tabla 11 muestra sus K_D por medición de Biacore. La caracterización *in vitro* muestra que los anticuerpos anti-CD3 1C10 y 2B4 son similares al control positivo SP34 anti-CD3 (BD Biosciences)

Tabla 11 Resultados cinéticos anti-xCD3e ab / bsc_hCD3ed para los datos ajustados de 80nM - 0,64nM

Ligando	**k_a**	**kd**	**$t_{1/2}$ (min)**	**KD (nM)**
UCHT1	1,80E+05	< 8,55E-04	➢ 13,5	< 4,74
2B4	3,74E+05	2,74E-03	4,21	7,33
1C10	2,96E+05	2,37E-03	4,88	8,00
SP34	2,84E+05	3,04E-03	3,80	10,73
7A3				82,70
1A4				99,97
Nota: Los datos sólo se presentan para los ajustes cinéticos satisfactorios. (+) = controles positivos * Las determinaciones cinéticas son **estimaciones aproximadas** porque el anticuerpo es heterogéneo. Sólo se mide la afinidad en estado estacionario				

Ejemplo 15: Estudio in *vitro* del anticuerpo biespecífico sobre la muerte mediada por células T

Este ejemplo ilustra la citotoxicidad *in vitro* del biespecífico anti-EpCam/CD3 en SW480 mezclado con células Pan T aisladas de un donante sano.

A: Anticuerpos anti-CD h2B4-1d, TK, hnpsTK y yaesTK

Los anticuerpos humanos anti-CD3 (h2B4-1d (o h2B4), h2B4-TK (o h2B4-VH-wt VL_TK), h2B4-hnpsTK (o h2B4-VH-hnps VL_TK) y h2B4-yaesTK (o h2B4-VH-yaes VL_TK)) y los anticuerpos humanos anti-EpCam se expresaron como IgG2dA humanos diseñados con RRRR o EEEE para el intercambio biespecífico como se describe en el Ejemplo 8.

El SW480 fue seleccionado como línea celular objetivo para el ensayo de muerte celular y las células efectoras y las células T humanas fueron purificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (huPBMC). Las células diana y efectoras se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos en un medio de cultivo celular que contenía un 5% de suero fetal bovino (FBS). El número de células objetivo se mantuvo constante en 2×10^{4} células/pocillo. Se añadió por triplicado a las células una dilución en serie de 10 veces del anticuerpo biespecífico, de 3ug a 3pg por ml. El volumen total de reacción fue de 200ul. Las reacciones se incubaron durante 48 y 72 horas. Para el análisis de la citotoxicidad, se midió cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se liberaba en el momento de la lisis celular, mediante el kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1780). La placa se leyó en un lector cinético de microplacas Vmax (Molecular Devices) a 490 nM. Los valores de densidad óptica se corrigieron para tener en cuenta el fondo del medio y la lisis espontánea de las células diana y efectoras. La citotoxicidad específica se calculó según la siguiente fórmula:

[% lisis específica = 490 nM lectura de muestra - de control mixto E+T)/(490 nM lectura de lisis de T total - de control del medio)x100%]

Las Figuras 11A y 11B muestran que todos los anticuerpos biespecíficos humanos anti-EpCam_h2B4 tuvieron actividad de eliminación de células en *el* ajuste *in vitro* , y la activación de células T mediada por el anticuerpo fue monitorizada por el marcador de activación de células T. La tabla 12A muestra su EC50. La Tabla 12B muestra el K_D de Biacore en el formato de anticuerpos biespecíficos.

Tabla 12A

Día2	**EC50**
h2B4-1d_Ep	537,1
h2B4-TK_Ep	405,3
h2B4-hnpsTK_Ep	424,7
h2B4-yaesTK_Ep	1126

Tabla 12B Tabla resumen de la cinética de los biespecíficos anti-CD3 hIgG2dA a 37°C

ID de la muestra - bschIgG2dA	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	t1/2 (min)	K_D (nM)
h2B4-1d_Ep	5,86E+05	2,37E-02	0,49	40,4
h2B4-TK_Ep	6,87E+05	2,13E-02	0,54	31,0
h2B4-hnpsTK_Ep	7,54E+05	2,35E-02	0,49	31,2
h2B4-yaesTK_Ep	4,74E+05	2,58E-02	0,45	54,4

B: Anticuerpos anti-CD m25A8, h25A8-B12 y h25A8-B13

Los anticuerpos humanos anti-CD3 h2B4(h2B4_1d) y h25A8 (m25A8, h25A8-B12, y h25A8-B13) y los anticuerpos humanos anti-EpCam se expresaron como IgG2dA humanos diseñados con RRRR o EEEE para el intercambio biespecífico como se describe en el Ejemplo 8.

Las Figuras 11C y 11D muestran que todos los anticuerpos biespecíficos humanos anti-EpCam_anti-CD3 tenían actividad de eliminación de células en el ajuste *in vitro*, y la activación de células T mediada por el anticuerpo fue monitorizada por el marcador de activación de células T. La tabla 12C muestra la EC50 de la muerte celular *in vitro*. La Tabla 12D muestra la cinética de Biacore en el formato de anticuerpos biespecíficos a 37°C. La Tabla 12E muestra la caracterización *in vitro* mediante SEC-MALS (Cromatografía de Exclusión de Tamaño con Dispersión de Luz Multiángulo) y DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido).

Tabla 12C: EC50 *de* muerte celular *in vitro*

Día 1:	EC50
h2B4-1d_Ep	52,9
m25A8_Ep	127,6
h25A8-B12_Ep	99,36
h25A8-B13_Ep	57,11

Tabla 12D: Tabla resumen de la cinética de los biespecíficos anti-CD3 hIgG2dA a 37°C

MuestraID -bschIgG2dA	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	t1/2 (min)	K_D (nM)
h25A8-B5_Ep	1,29E+06	5,81E-02	0,20	45,0

MuestraID -bschIgG2dA	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	t1/2 (min)	K_D (nM)
h25A8-B8_Ep	1,19E+06	2,22E-02	0,52	18,7
h25A8-B12_Ep	1,15E+06	2,41E-02	0,48	21,0
h25A8-B13_Ep	1,20E+06	2,19E-02	0,53	18,3
h25A8-C8_Ep	1,20E+06	3,01E-02	0,38	25,1
h2B4-1d_Ep	5,86E+05	2,37E-02	0,49	40,4

Tabla 12E: caracterización *in vitro*

	SEC-MALS		DSC		
	% Monómero	% Agregado	Tm1 C (CH2)	Tm2 C (Fab)	Tm3 C (CH3)
m28A8	99,9	0,1	66,3	67,8	76,1
hIgG2dA_h25A8-B12	99,2	0,8	70,91	73,06	78,31
hIgG2dA_h25A8-B13	99,5	0,5	70,88	72,86	78,2
hIgG2dA-h2B4TK	98,8	1,4	70,2	74,5	79,4

Ejemplo 16: Estudio in *vitro* del anticuerpo biespecífico sobre la muerte mediada por células T de muestras de pacientes con mieloma primario.

Este ejemplo ilustra la citotoxicidad *in vitro* del biespecífico anti-BCMA/CD3 en células primarias de mieloma.

Los anticuerpos humanos anti-BCMA (P5A2, A02_Rd4_0,6nM_C01, A02_Rd4_6nM_C16, Combo_Rd4_0,6nM_C29, y P6E01 L3PY/H3TAQ) y los anticuerpos humanos anti-CD3 (h2B4) se expresaron como IgG2dA humanos diseñados con EEEE o RRRR para el intercambio biespecífico como se describe en el Ejemplo 8.

Las células mononucleares de médula ósea totales de pacientes con mieloma se sembraron en placas transparentes de fondo en U en números de células mononucleares de médula ósea totales que dieron como resultado 3000-5000 células de mieloma/pocillo. Las células se trataron con anticuerpos biespecíficos diluidos en serie 10 veces. Cinco días después del tratamiento, se determinaron las células viables totales mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD138 y CD38 (Biolegend, CA). Las células se incubaron con los anticuerpos a 4° en PBS + 0,5% FBS durante 30 minutos. Se lavaron las células y se añadió el colorante de viabilidad fijable eFluor 780 (eBioscience, Inc., CA) en PBS a las células durante 30 minutos a 4°. Antes de la adquisición de células en un citómetro de flujo BD, se lavaron las células y se añadieron las cuentas de recuento absoluto CountBright (Molecular Probes, OR). El porcentaje de células vivas se determinó como el recuento de células vivas en los pocillos tratados frente a los no tratados utilizando perlas de recuento. La EC50 se calculó con el software Prism.

La Tabla 13A muestra que todos los anticuerpos biespecíficos humanos anti-BCMA_h2B4 tienen actividad de destrucción celular en muestras de pacientes con mieloma y las células T de los pacientes son células efectoras funcionales. La Tabla 13B muestra la eliminación de un biespecífico anti-BCMA en muestras de pacientes con mieloma múltiple con diferentes relaciones de efector a diana (E:T).

Tabla 13A

Anti-BCMA biespecífico (Paciente MM00146)	**EC50**
P6E01 L3PY/H3TAQ	0,015
P5A2	0,946
A02_Rd4_0,6nM_C01	0,064
A02_Rd4_6nM_C16	0,029
NNC_2b41d hIqG2dA	3,302

Tabla 13B

Paciente	Combo_Rd4_0,6nM_C29 EC50 (nM)	E:T
MM00146	0,035	1/1
MM00147	0,031	2:1
MM00151	0,02	3:1
MM00152	0,289	1:2

Ejemplo 17: ELISPOT de células secretoras de anticuerpos de monos cynomolgus administrados con anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/CD3

Este ejemplo ilustra el agotamiento de las células secretoras de IgG en el mono cynomolgus con anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/CD3.

Los monos Cynomolgus (n=2) fueron dosificados mediante inyección intravenosa en bolo con anticuerpos biespecíficos anti-BCMA_CD3 (h2B4-VH-hnps VL_TK), A02_Rd4_0,6nM_C01/H2B4 y Combo_Rd4_0,6nM_C29/H2B en dos dosis, el día 1 y el día 8, de 100 ug/kg y 300 ug/kg. Los animales fueron observados dos veces al día y en cada punto de recogida de sangre. Se tomaron muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en los días -6, 4 y 10. Las muestras de médula ósea se tomaron el día 10, cuando se realizó la necropsia de los animales.

La sangre se recolectó en tubos de preparación celular Becton Dickinson® CPT™ que contenían heparina sódica y un gradiente de densidad, y luego las PBMC se recolectaron en la interfaz del gradiente tras la centrifugación.

Se recolectó una muestra de médula ósea (de fémur) mediante lavado con aproximadamente 5 ml de suero fetal bovino (FBS) al 100% y luego se prepararon suspensiones de células individuales suspendiendo la médula lavada en 50 ml de tampón.

Las células se contaron utilizando el Cellometer Vision y se ajustaron con medio de cultivo completo RPMI 1640 a una concentración de 5 $\times 10^6$ células por ml para PBMC y 2 $\times 10^6$ células por ml para células de médula ósea. Las células secretoras de IgG totales se enumeraron utilizando el kit ELISpot^{BASIC} de Mabtech (#3850-2HW-Plus). Brevemente, se añadieron PBMC o células de médula ósea a pocillos triplicados a concentraciones específicas (PBMC a 5 $\times 10^5$/pocillo, y células de médula ósea a 2 $\times 10^5$/pocillo), y luego se diluyeron las células en serie en la placa. Tras una incubación de una noche, se lavaron las placas y se añadió un anticuerpo de detección biotinilado. Las placas se incubaron durante 2 horas y se añadió estreptavidina-HRP durante 1 hora. Las manchas de IgG se visualizaron con una solución de sustrato TMB y se contaron con el sistema ImmunoSpot Imaging Analyzer (CTL) y el software ImmunoSpot 5,1. Los datos se expresaron como la media (+/- SD) del número de células secretoras de IgG de muestras triplicadas.

El recuento resultante de células secretoras de IgG en PBMC y en la médula ósea se enumeran en las Tablas 14A y 14B, respectivamente. Se observó un agotamiento de las células secretoras de IgG para ambos anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/CD3 en PBMC en comparación con la dosis previa y en la médula ósea en comparación con el vehículo y el control negativo. Se observó un efecto dependiente de la dosis en la médula ósea.

Tabla 14A

PBMC	Día		
	-6	4	10
Vehículo	204:320	323:538	127:137
0,1 mg/kg Combo_Rd4_0,6nM_C29	107:128	5:0	0,0
0,3 mg/kg Combo Rd4 0,6nM C29	304:362	0,5	0,0
0,1 mg/kg A02 Rd4 0,6nM C01	447:672	16:27	21,10
0,3 mg/kg A02 Rd4 0,6nM C01	512:224	25:8	0/0
0,3mg/kg NNC 2b41d	139:361	1345:1154	≥992:928

Tabla 14B

Médula ósea	Día 10
Vehículo	2614:8093
0,1 mg/kg Combo Rd4 0,6nM C29	35:18
0,3 mg/kg Combo Rd4 0,6nM C29	35:22
0,1 mg/kg A02 Rd4 0,6nM C01	996:960
0,3 mg/kg A02 Rd4 0,6nM C01	2170:93
0,3mg/kg NNC 2b41d	5980:2893

Ejemplo 18: Los biespecíficos anti-BCMA/CD3 inducen la regresión e inhibición del tumor en el modelo tumoral MM1.S

Este ejemplo ilustra la regresión e inhibición del tumor en un modelo ortotópico de mieloma MM1.S.

El estudio de eficacia in *vivo* de los biespecíficos BCMA se realizó con el modelo ortotópico MM1.S, que expresa luciferasa y GFP. Un día antes de la inyección de células tumorales, los ratones fueron irradiados con 100cGy utilizando el irradiador RS 2000 Biological Research (RAD Source Technolgies, GA). Se inyectaron cinco millones de células MM1.S LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales hembra Nod/Scid/IL2Rg$^{-/-}$ (NSG) de 6-8 semanas de edad. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200uL por animal a 15mg/ml), seguida de anestesia con isofluorano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI) permitieron monitorizar la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y la luciferina se capturaron mediante imágenes utilizando un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantificaron como flujo total (fotones/seg) utilizando Living Image 4,4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Cuando el flujo total alcanzó una media de 15E6 para todos los animales, éstos fueron inyectados a través de la vena de la cola en bolo con 20 millones de células T expandidas de PBMC. Brevemente, las células pan-T compradas a AllCells (Alameda, CA) se activaron con el kit de activación/expansión de células T humanas (Miltenyi, San Diego, CA). Después de tres días, se añadieron 15U/ml de IL2 (ebioscience, San Diego, CA) cada dos días hasta el día 11. Se recolectaron las células, se retiraron magnéticamente las perlas de activación/expansión y se lavaron y resuspendieron las células en PBS. Un día después de la inyección de células T, se tomaron imágenes de los ratones como se ha descrito anteriormente y los animales fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de siete ratones; A02_Rd4_0,6nM_C01 a 0,03 mg/kg y 0,3 mg/kg y Combo_Rd4_0,6nM_C29 a 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg. Se administró una dosis única de anticuerpo biespecífico humano anti-BCMA/CD3 (h2B4-VH-wt VL_TK) y de control negativo (NNC) mediante una inyección en bolo en la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados cuando mostraron parálisis de las extremidades posteriores, un punto final para el modelo ortotópico MM1.S. La figura 12 muestra que una dosis única de anticuerpo biespecífico humano anti-BCMA/CD3 produjo una regresión tumoral de forma dependiente de la dosis.

Ejemplo 19: Dos dosis de anti-BCMA/CD3 biespecíficos inducen la regresión tumoral en un modelo tumoral agresivo Molp8

Este ejemplo ilustra la regresión tumoral con dos dosis de anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/CD3 en un modelo de mieloma Molp8 ortotópico.

El estudio de eficacia in *vivo* de los biespecíficos BCMA se realizó con Molp8, expresando luciferasa y GFP, en un modelo ortotópico. Se inyectaron dos millones de células Molp8 LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales hembra NSG de 6-8 semanas de edad. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200uL por animal a 15mg/ml), seguida de anestesia con isofluorano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI) permitieron monitorizar la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y la luciferina se capturaron mediante imágenes utilizando un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantificaron como flujo total (fotones/seg) utilizando Living Image 4,4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Cuando el flujo total alcanzó una media de 25E6 para todos los animales fueron distribuidos al azar en tres grupos de siete ratones; 1) Combo_Rd4_0,6nM_C29, 0,3 mg/kg, 2) Combo_Rd4_0,6nM_C29, 0,3 mg/kg, dos dosis y 3) NNC_2B4, 0,3 mg/kg, dos dosis. Los animales fueron inyectados a través de la vena de la cola en bolo con 20 millones de células T expandidas como se describe en el Ejemplo 18. Dos días después de la inyección de células T, los ratones fueron dosificados con anticuerpos biespecíficos. Los animales fueron sacrificados cuando mostraron una pérdida de peso superior al 15%, un punto final para el modelo ortotópico Molp8. La figura 13 muestra que dos dosis del anticuerpo biespecífico humano anti-BCMA/CD3 (h2B4-VH-wt VL_TK) dieron lugar a una mayor regresión del tumor.

Ejemplo 20: Anti-BCMA/CD3 biespecífico en combinación con el tratamiento estándar para el mieloma múltiple en el modelo tumoral ortotópico Molp8

Este ejemplo demuestra que no hay efectos opuestos en los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/CD3 cuando se combinan con bortezomib o lenalidomida y una mejor potencia con los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/CD3 en comparación con bortezomib y lenalidomie combinados.

El estudio de eficacia in *vivo* de los biespecíficos BCMA se realizó con Molp8, expresando luciferasa y GFP, en un modelo ortotópico. Se inyectaron dos millones de células Molp8 LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales hembra NSG de 6-8 semanas de edad. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200uL por animal a 15mg/ml), seguida de anestesia con isofluorano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo entero (BLI) permitieron monitorizar la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y la luciferina se capturaron mediante imágenes utilizando un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantificaron como flujo total (fotones/seg) utilizando Living Image 4,4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Los animales fueron inyectados a través de la vena de la cola en bolo el día 7 con 20 millones de células T expandidas como se describe en el Ejemplo 18. Dos días después de la inyección de células T, se tomaron imágenes de los ratones y se distribuyeron al azar en cinco grupos de siete ratones con una media de 17E6 de flujo total por grupo: 1) Combo_Rd4_0,6nM_C29, 0,3 mg/kg, 2) Combo_Rd4_0,6nM_C29, 0,3 mg/kg y 1mg/kg de bortezomib, 3) Combo_Rd4_0,6nM_C29, 0,3 mg/kg y 50 mg/kg de lenalidomida, 4) 1 mg/kg de bortezomib y 50 mg/kg de lenalidomida y 5) vehículo. El anti-BCMA/CD3 (en PBS) se inyectó en bolo en la vena de la cola, el bortezomib (en PBS) se administró por inyección intraperitoneal y la lenalidomida (30% PEG400/5% propilenglicol/0,5% Tween80) por vía oral. El vehículo consistió en un 30% de PEG400/5% de propilenglicol/0,5% de Tween80, que se administró por vía oral. Los animales fueron sacrificados cuando mostraron una pérdida de peso superior al 15%, un punto final para el modelo ortotópico Molp8. La figura 14 muestra que la combinación de un anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 (h2B4-VH-hnps VL-TK) con bortezomib o lenalidomida no tuvo un efecto negativo sobre la eficacia del anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3. En este modelo, el anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 solo o en combinación con lenalidomida o bortezomib es más eficaz que la lenalidomida y el bortezomib combinados.

Ejemplo 21: Estudio in *vitro* del biespecífico anti-BCMA/CD3 en combinación con lenalidomida, carfilzomib o doxorrubicina en la línea celular OPM2

Este ejemplo ilustra que no hay efectos adversos en la función de las células T cuando se combina con carfilzomib, doxorrubicina y lenalidomida para la actividad del anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 en comparación con el anticuerpo biespecífico solo.

Las células T CD3+ de PBMC fueron seleccionadas negativamente utilizando el kit de aislamiento de células T Pan, humanas (Miltenyi, San Diego CA). Las células OPM2 y las células T CD3+ se sembraron en placas transparentes con fondo en U, a razón de 20000 y 100000 células/pocillo, respectivamente. Las células T OPM2 y CD3+ se incubaron primero con el estándar de cuidado durante dos horas a 37°. 1.Se diluyeron 56 nM de carfilzomib y 6,25 nM de doxorrubicina en PBS con 0,02% de DMSO. La lenalidomida se diluyó en PBS con 0,1% de DMSO a 195nM. Las células se trataron con anticuerpos biespecíficos diluidos en serie 10 veces. Tres días después del tratamiento, se determinaron las células viables totales mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD138, CD4 y CD8 (Biolegend). Las células se incubaron con los anticuerpos a 4° en PBS + 0,5% FBS durante 30 minutos. Se lavaron las células y se añadió el colorante de viabilidad fijable eFluor 780 (eBioscience, Inc., CA) en PBS a las células durante 30 minutos a 4°. Antes de la adquisición de células en un citómetro de flujo BD, se lavaron las células y se añadieron las cuentas de recuento absoluto CountBright (Molecular Probes, OR). El porcentaje de células vivas se determinó como el recuento de células vivas en los pocillos tratados frente a los no tratados utilizando perlas de recuento. Las figuras 15A, 15B y 15C, respectivamente, muestran que el carfilzomib, la lenalidomida y la doxorrubicina no tienen un efecto negativo sobre la función del anticuerpo biespecífico Combo_Rd4_0,6nM_C29-CD3 (h2B4-VH-hnps VL-TK) en las células OPM2.

Ejemplo 22: Estudio in *vitro* del biespecífico anti-BCMA/CD3 en combinación con lenalidomida y carfilzomib en la línea celular KMS12BM

Este ejemplo ilustra los efectos sinérgicos en la función biespecífica anti-BCMA/CD3 cuando se combina con carfilzomib y lenalidomida en comparación con cada molécula por separado.

Las células T CD3+ de PBMC fueron seleccionadas negativamente utilizando el kit de aislamiento de células T Pan, humanas (Miltenyi, San Diego CA). Las células KMS12BM y las células T CD3+ se sembraron en placas transparentes de fondo en U de 20000 y 100000 células/pocillo, respectivamente. Las células fueron tratadas con 0,017 nM anti-BCMA/CD3 biespecífico en combinación con carfilzomib y un intervalo de concentración de lenalidomida. 1.Se diluyeron 25 nM de carfilzomib en PBS con 0,02% de DMSO. La lenalidomida se diluyó en PBS que contenía un 0,1% de DMSO a partir de 4uM diluido 4 veces. Tres días después del tratamiento, se determinaron las células viables totales mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD138, CD4 y CD8 (Biolegend, CA). Las células se incubaron con los anticuerpos a 4° en PBS + 0,5% FBS durante 30 minutos. Se lavaron las células y se añadió el colorante de viabilidad fijable eFluor 780 (eBioscience, Inc., CA) en PBS a las células durante 30 minutos a 4°. Antes de la adquisición de células en un citómetro de flujo BD, se lavaron las células y se añadieron las cuentas de recuento absoluto CountBright (Molecular Probes, OR). El porcentaje de células vivas se determinó como el recuento de células vivas en los pocillos tratados frente a los no tratados utilizando perlas de recuento. La figura 16 muestra que, a las

concentraciones probadas, el carfilzomib, la lenalidomida y el anticuerpo biespecífico anti-BCMA/CD3 (h2B4-VH-hnps VL-TK) tenían muy poca función citotóxica como agentes únicos. Cuando se combinaron los tres agentes, se observó un efecto sinérgico a una concentración de lenalidomida dependiente de la dosis en las células KMS12BM.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable de anticuerpo que se une específicamente a CD3 y un segundo dominio variable de anticuerpo que se une específicamente a BCMA, en el que el primer dominio variable de anticuerpo comprende:

una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 331; (ii) una VH CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 336; y (iii) una VH CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 335; y
una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 343; (ii) una VL CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 341; y (iii) una VL CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 342;
y el segundo dominio variable del anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 156; (ii) una VH CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 158; y (iii) una VH CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 155; y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende (i) una VL CDR1 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 209; (ii) una VL CDR2 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 221; y (iii) una VL CDR3 que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 225.

2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que el primer dominio variable del anticuerpo comprende:

una región variable (VH) de la cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 324; y una región variable (VL) de la cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 323;
y el segundo dominio variable del anticuerpo comprises:

una región variable (VH) de la cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 112
y una región variable (VL) de la cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 38.

3. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende una región constante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 496.

4. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende una región constante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 497.

5. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

6. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.

7. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6.

8. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para usar como medicamento.

9. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento del cáncer.

10. El anticuerpo biespecífico o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 9, en la que el cáncer es un cáncer relacionado con las células B que se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular, enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma no Hodgkin de células B (LNH), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor, leucemia mieloide, macroglobulienemia de Waldenstrom, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de tejido linfático asociado a mucosas, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma primario de células B grandes del mediastino (tímico), linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma difuso de células B grandes primario cutáneo (tipo de pierna), linfoma difuso de células B grandes positivo para el VEB de los ancianos, linfoma difuso de células B grandes asociado con la inflamación, linfoma de células B grandes positivo para ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico, y otros linfomas relacionados con las células B.

11 El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un procedimiento de tratamiento del mieloma múltiple, en el que el anticuerpo biespecífico se administran con uno o más agentes terapéuticos.

12. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 11, en la que el otro agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en bortezomib, lenalidomida, carfilzomib y doxorrubicina.

Figura 1A

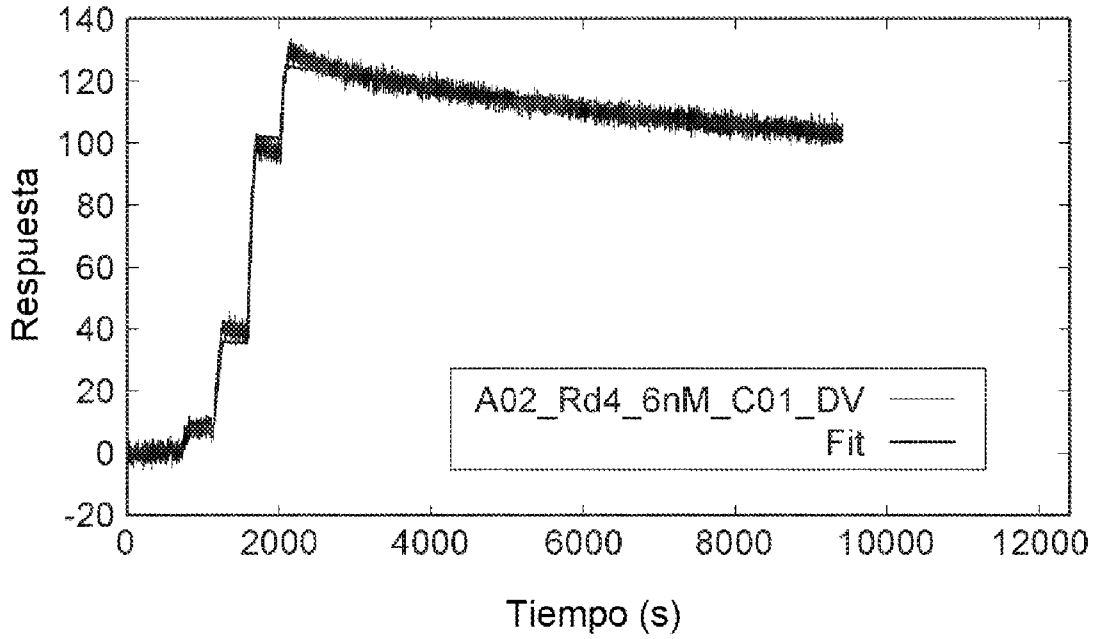


Figura 1B

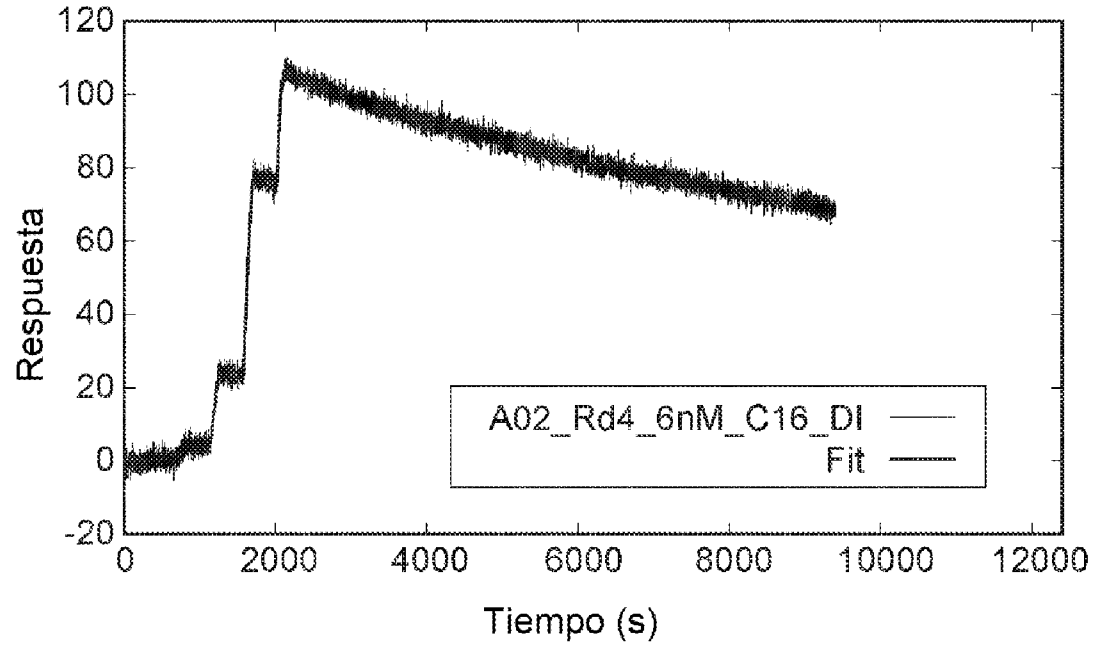


Figura 1C

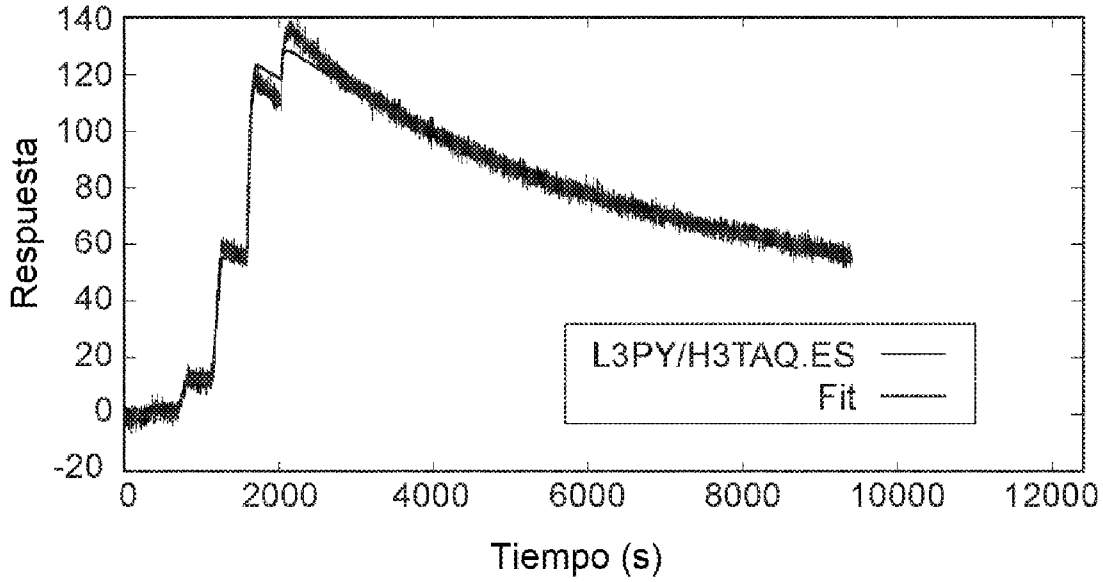


Figura 1D

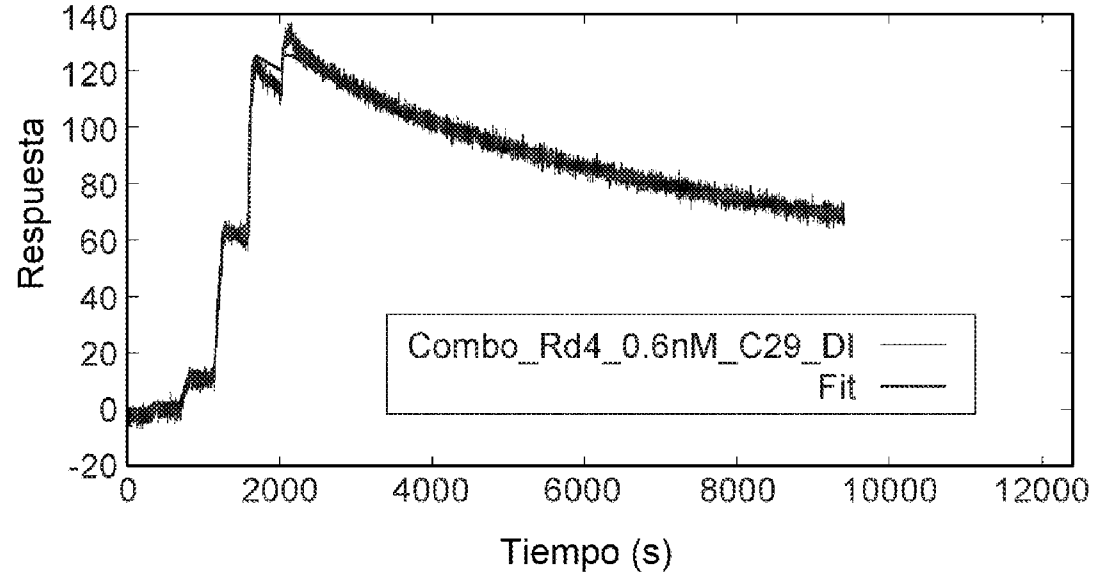


Figura 2

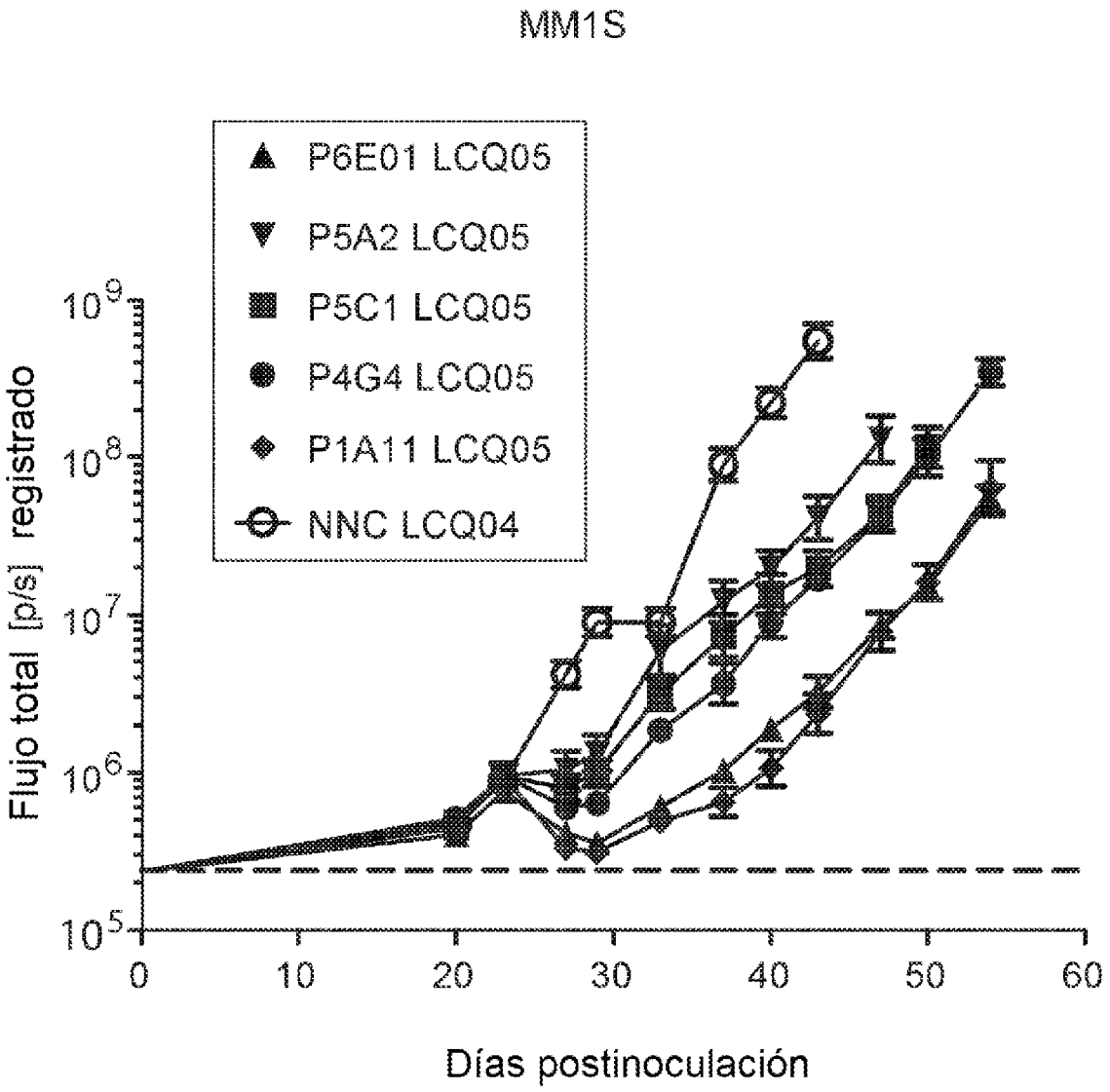

MM1S
P6E01 LCQ05
P5A2 LCQ05
P5C1 LCQ05
P4G4 LCQ05
P1A11 LCQ05
NNC LCQ04
Flujo total [p/s] registrado
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
10
20
30
40
50
60
Días postinoculación

Figura 3

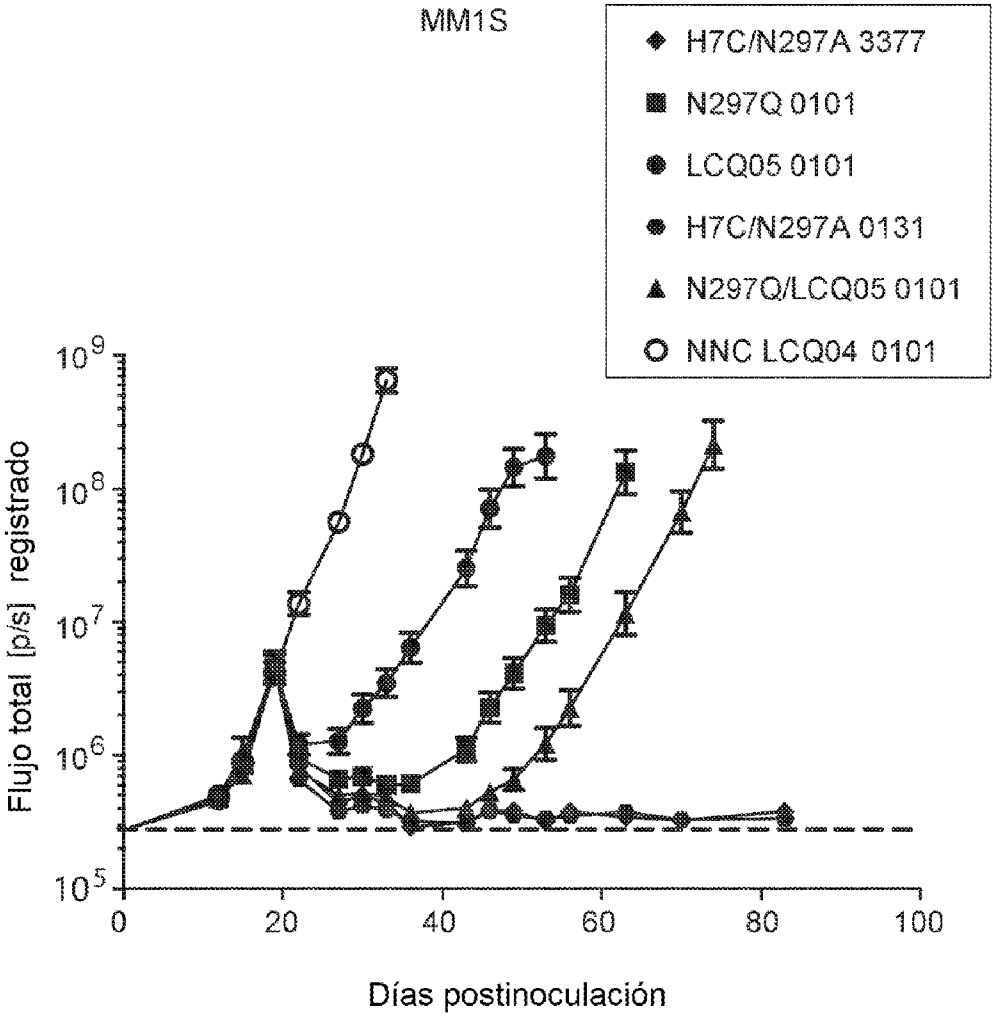

MM1S
H7C/N297A 3377
N297Q 0101
LCQ05 0101
H7C/N297A 0131
N297Q/LCQ05 0101
NNC LCQ04 0101
Flujo total [p/s] registrado
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
20
40
60
80
100
Días postinoculación

Figura 4

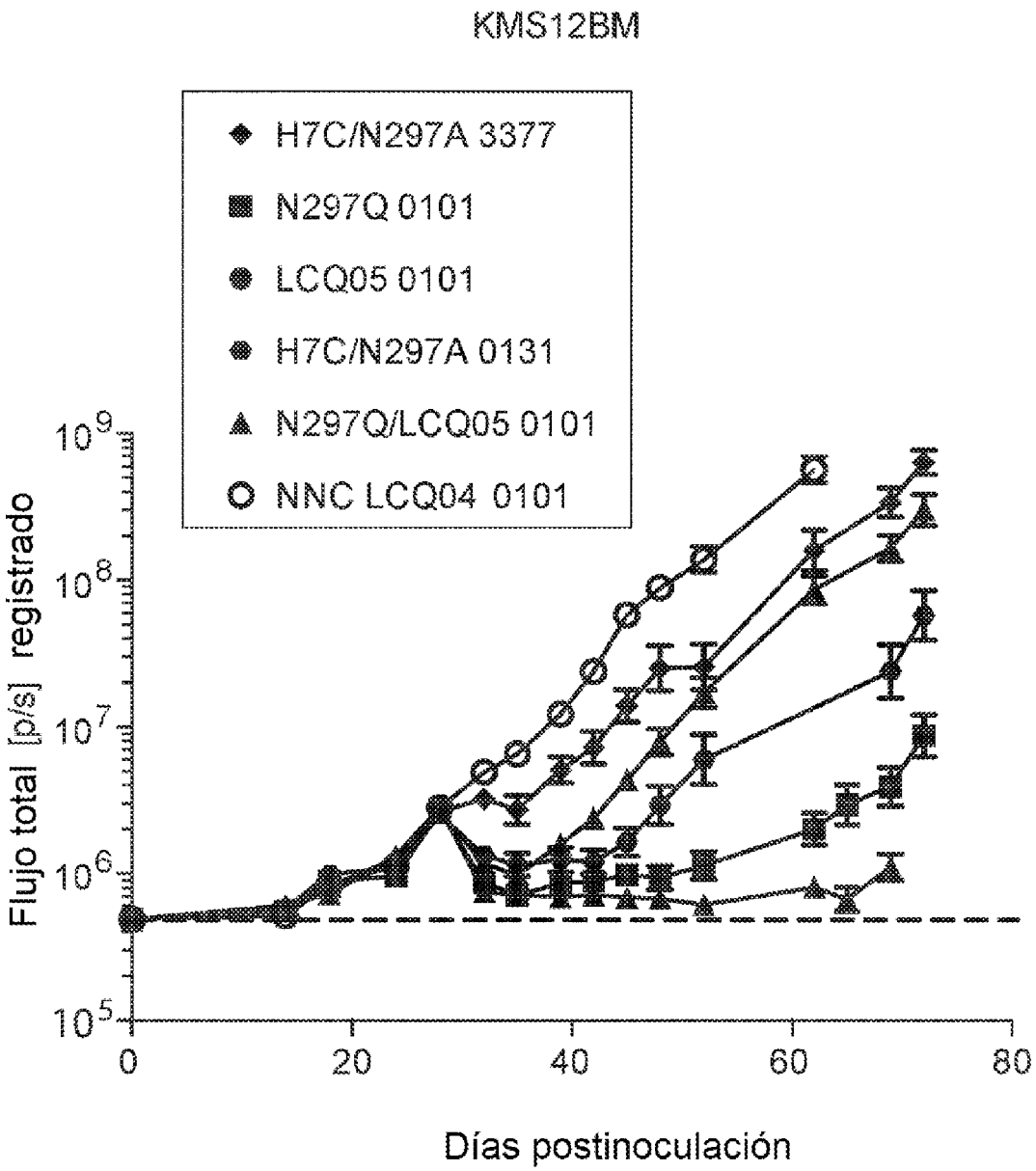

KMS12BM
H7C/N297A 3377
N297Q 0101
LCQ05 0101
H7C/N297A 0131
N297Q/LCQ05 0101
NNC LCQ04 0101
Flujo total [p/s] registrado
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
20
40
60
80
Días postinoculación

Figura 5

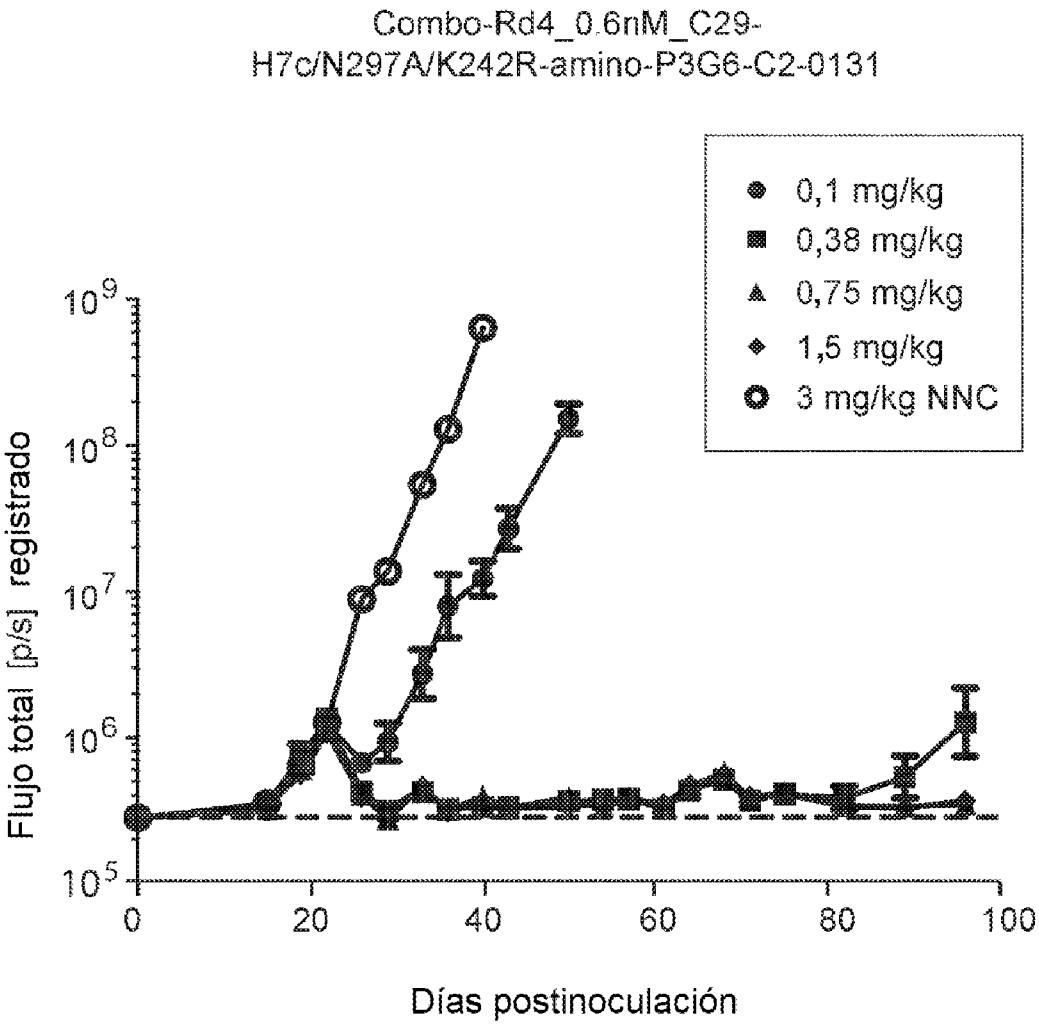

Combo-Rd4_0.6nM_C29-
H7c/N297A/K242R-amino-P3G6-C2-0131
0,1 mg/kg
0,38 mg/kg
0,75 mg/kg
1,5 mg/kg
3 mg/kg NNC
Flujo total [p/s] registrado
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
20
40
60
80
100
Días postinoculación

Figura 6A

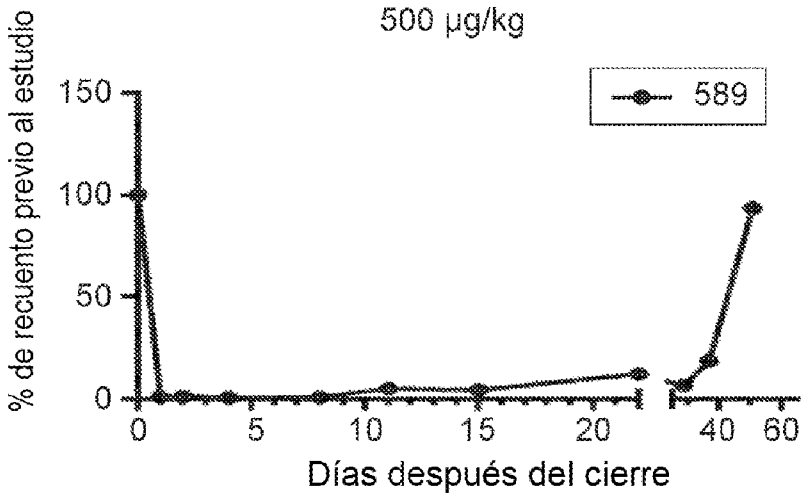


Figura 6B

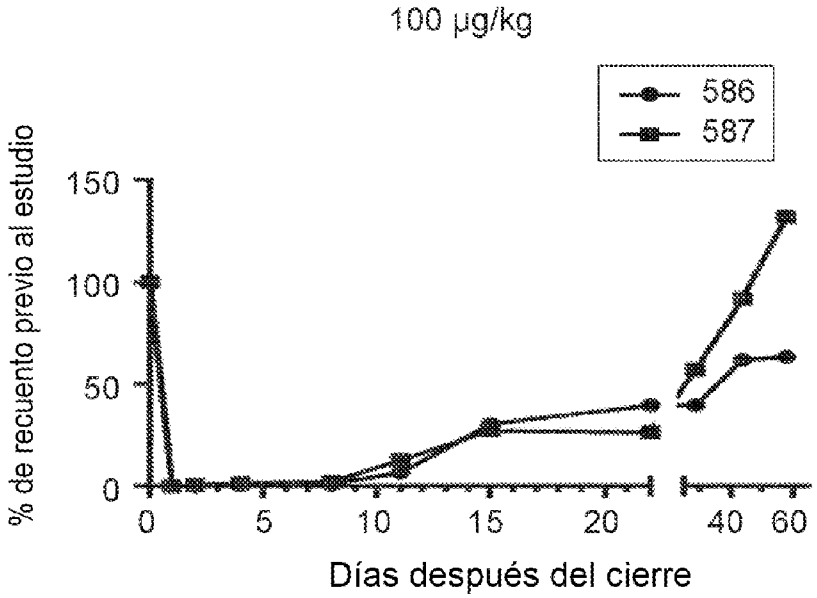


Figura 6C

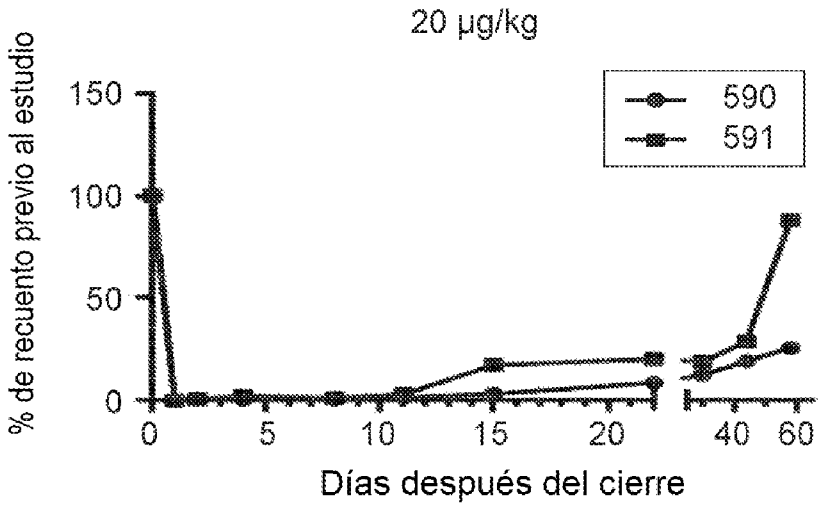


Figura 6D

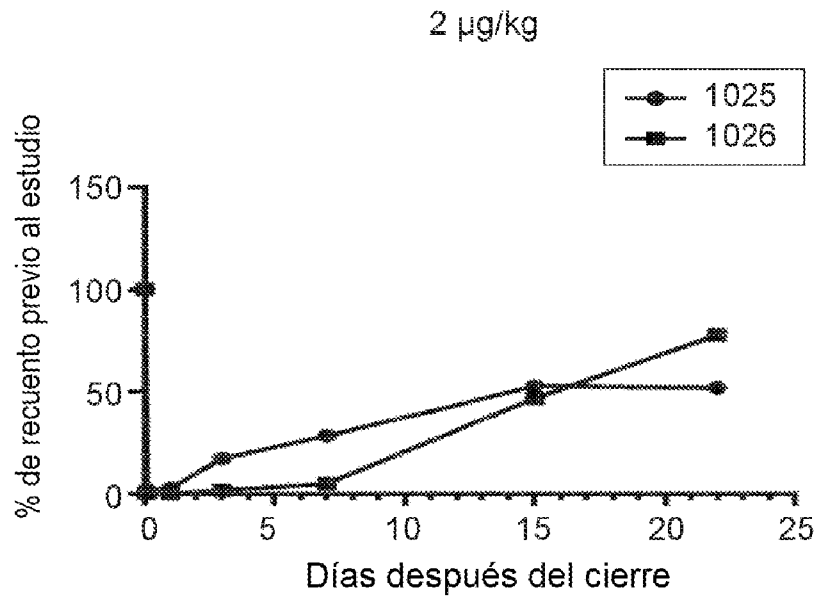


Figura 6E

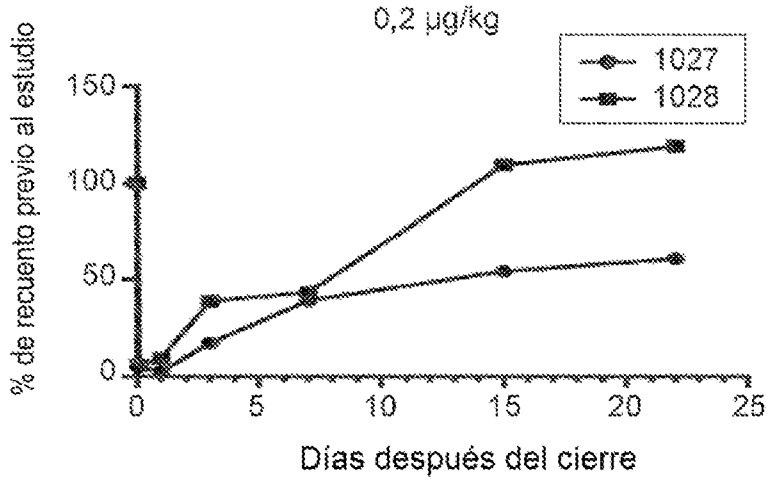


Figura 6F

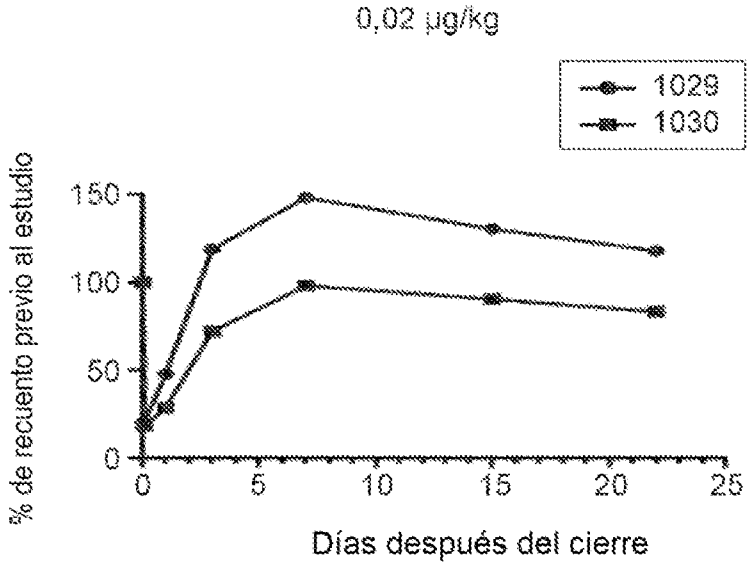


Figura 7A

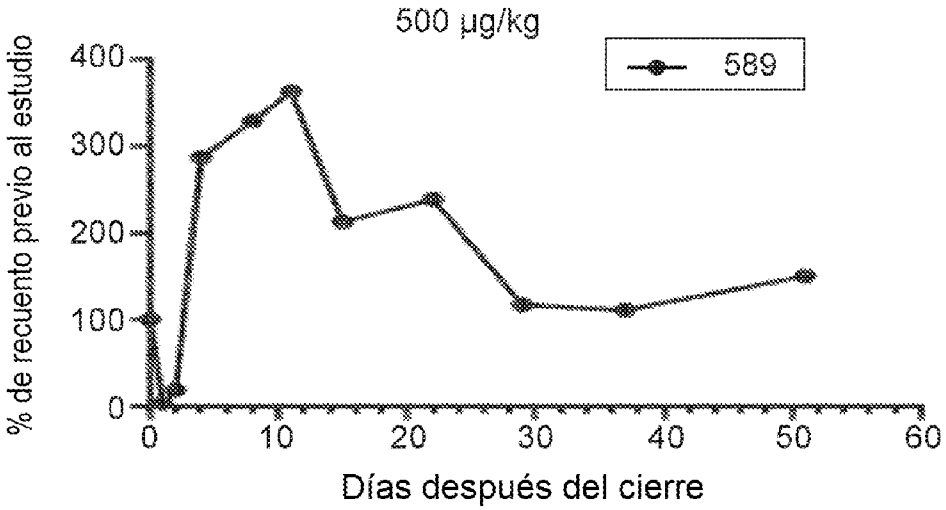


Figura 7B

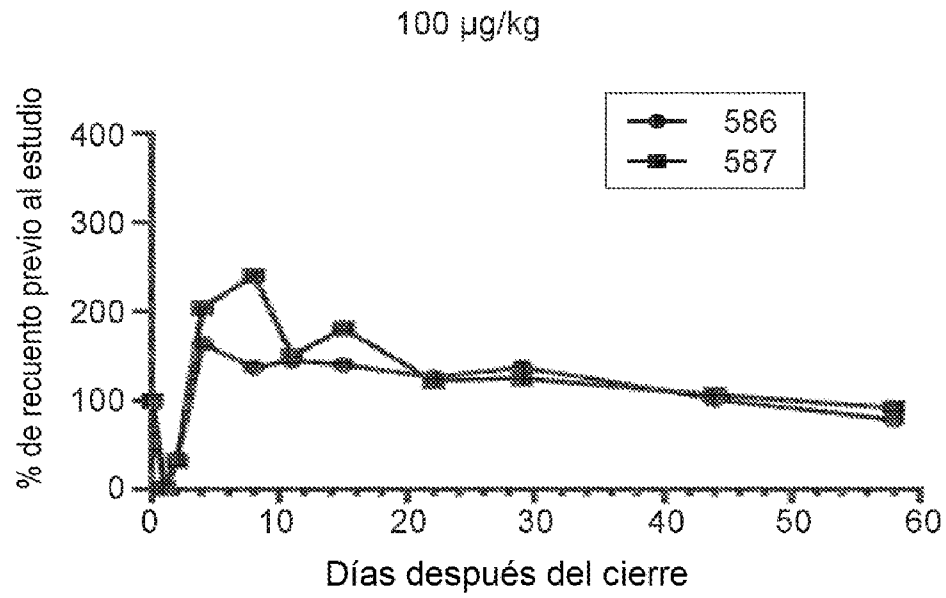


Figura 7C

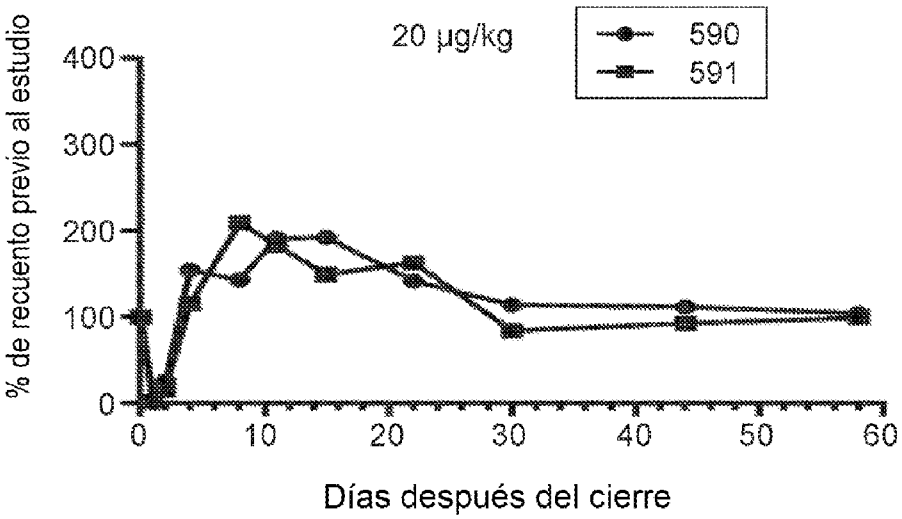


Figura 7D

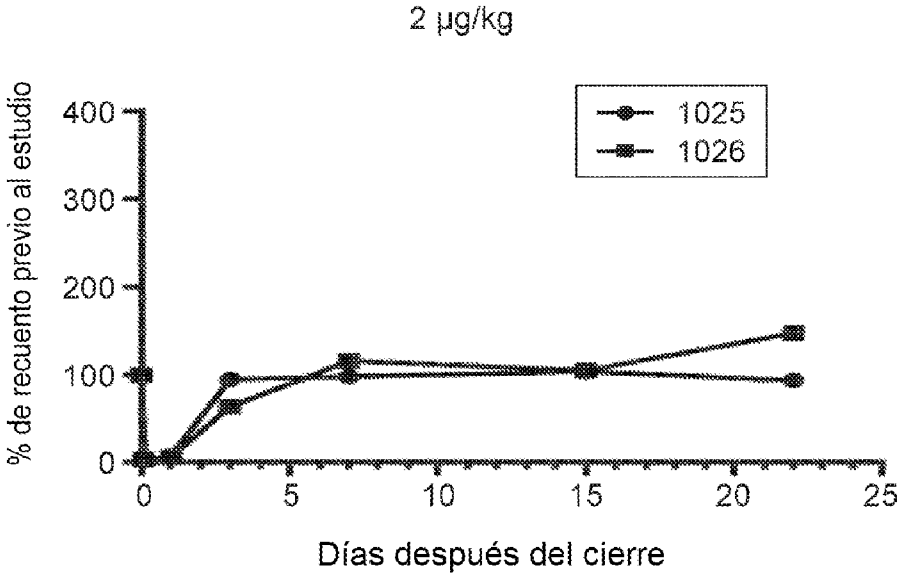


Figura 7E

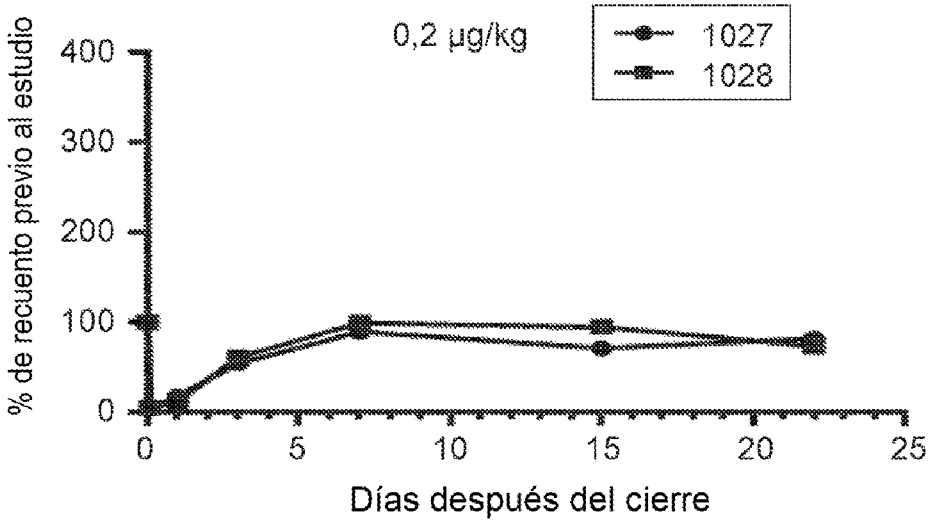


Figura 7F

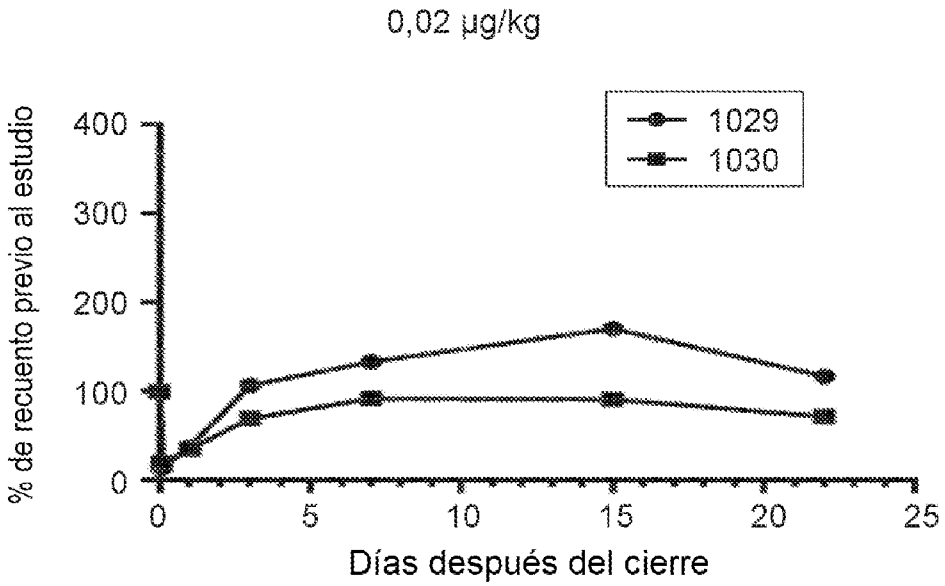


Figura 8A

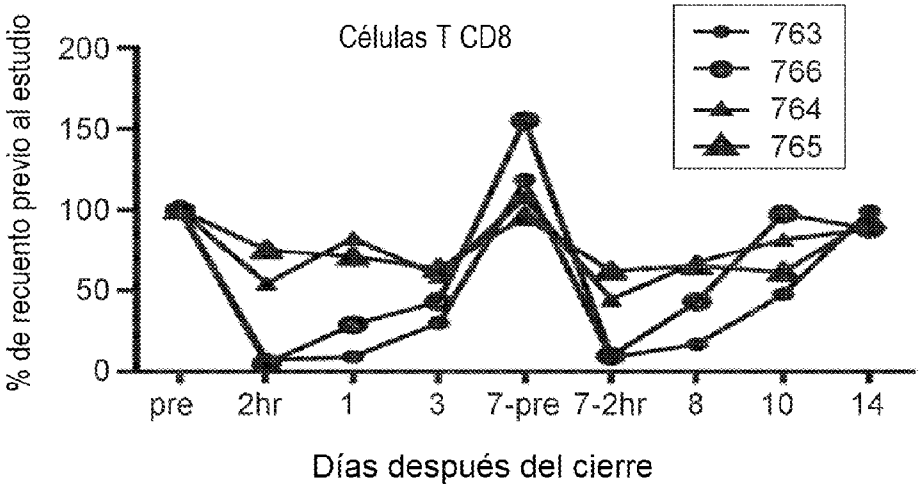


Figura 8B

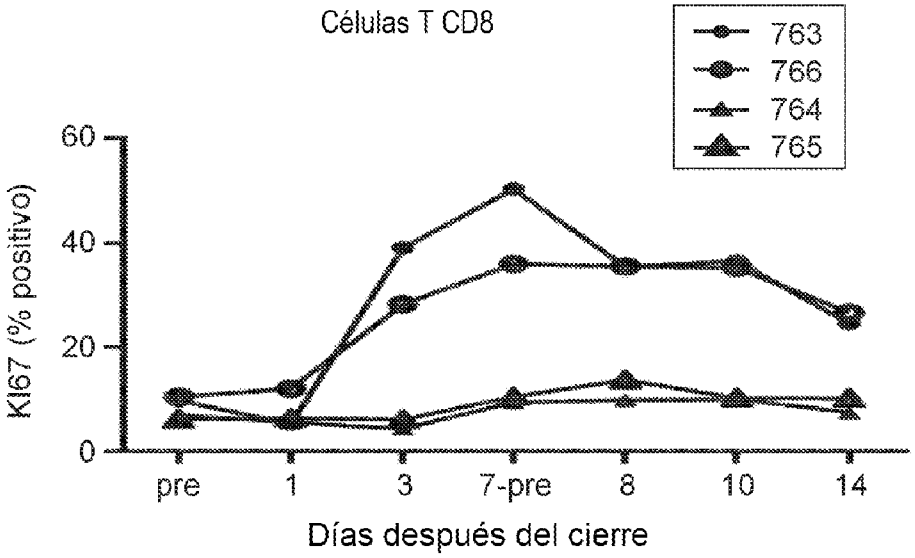


Figura 9A

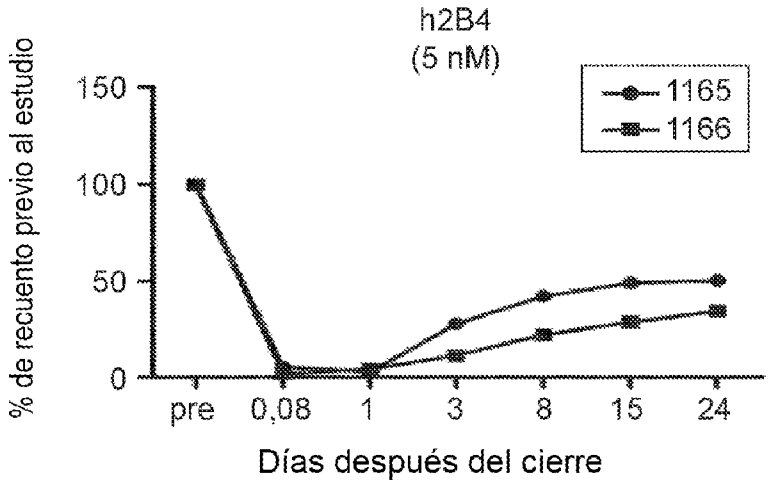


Figura 9B

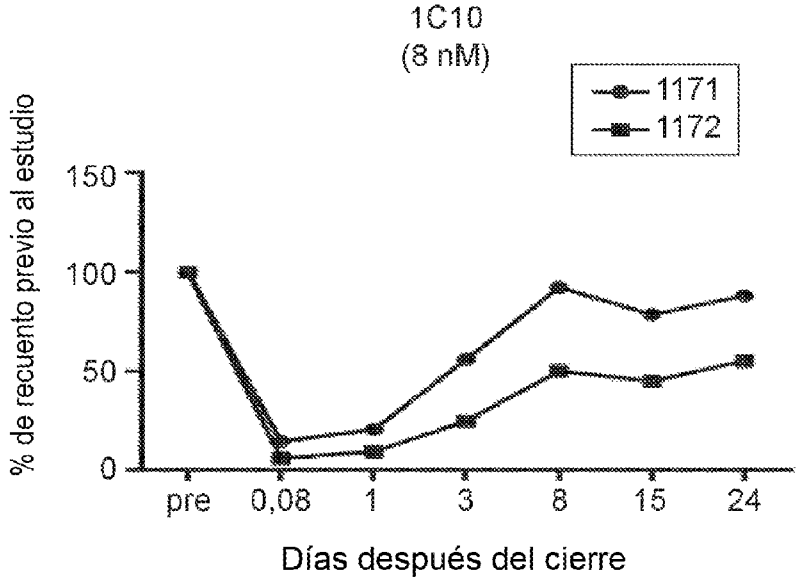


Figura 9C

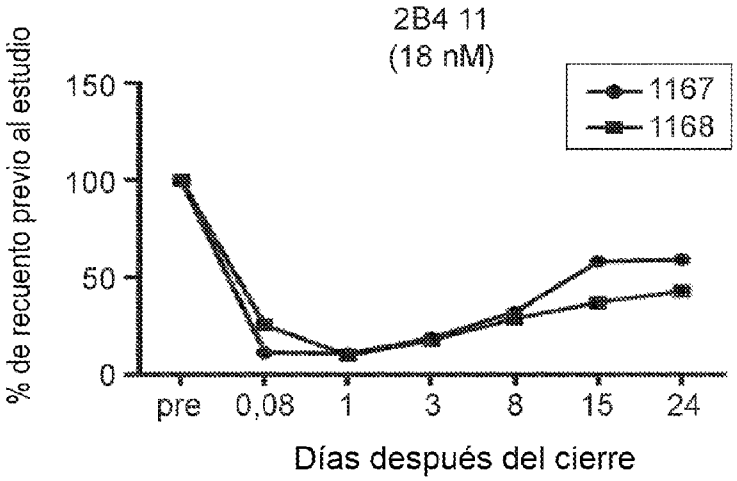


Figura 9D

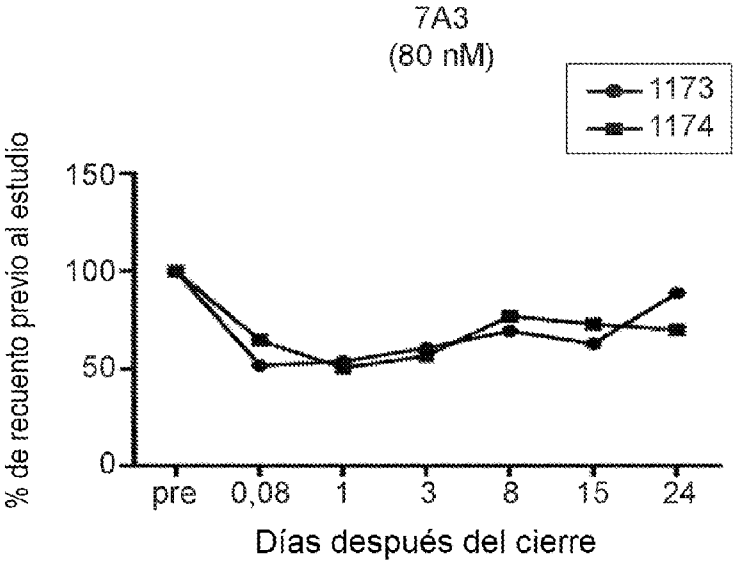


Figura 10A

Activación/Proliferación de células T cuantificada por incorporación de ^{3}H en PBMC humanas: **48 hrs después**

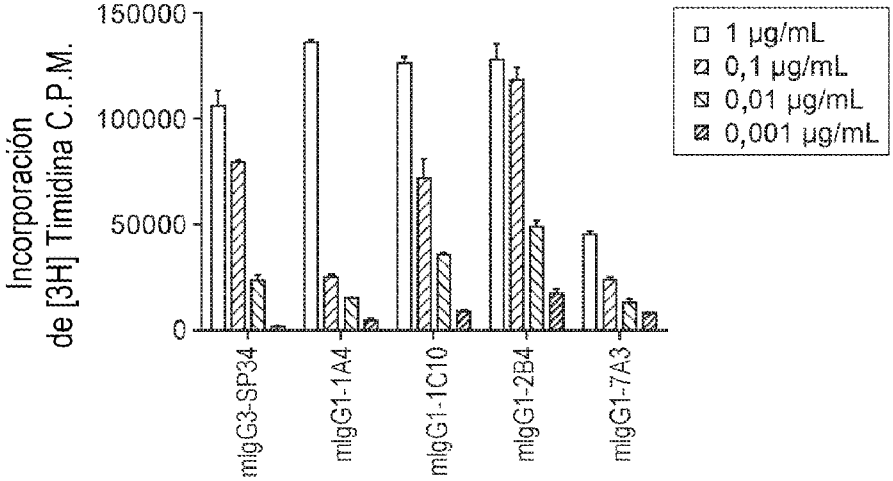


Figura 10B

Activación/Proliferación de células T Cuantificada por incorporación de ^{3}H en PBMC de cynomolgus: **48 hrs después**

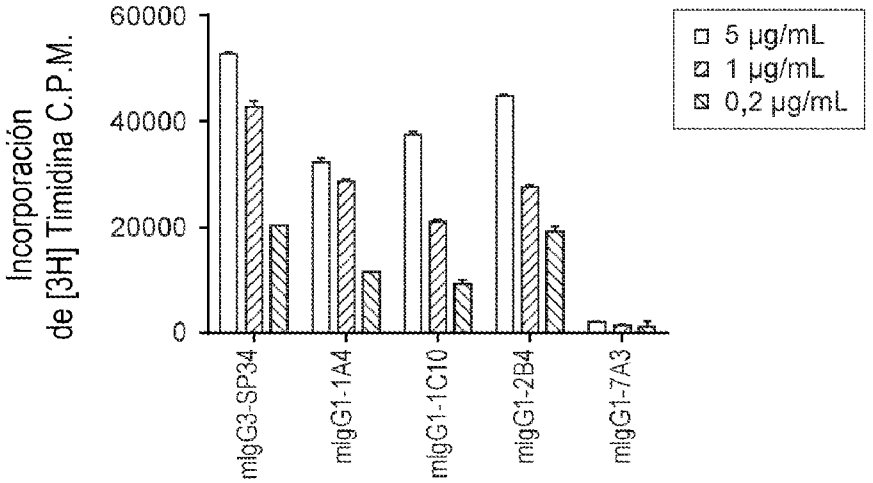


Figura 11A

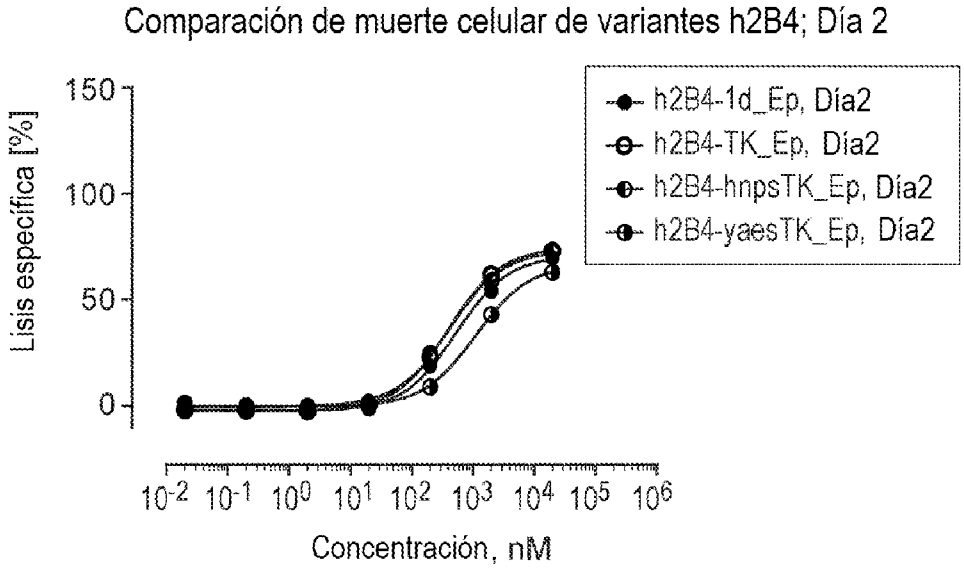


Figura 11B

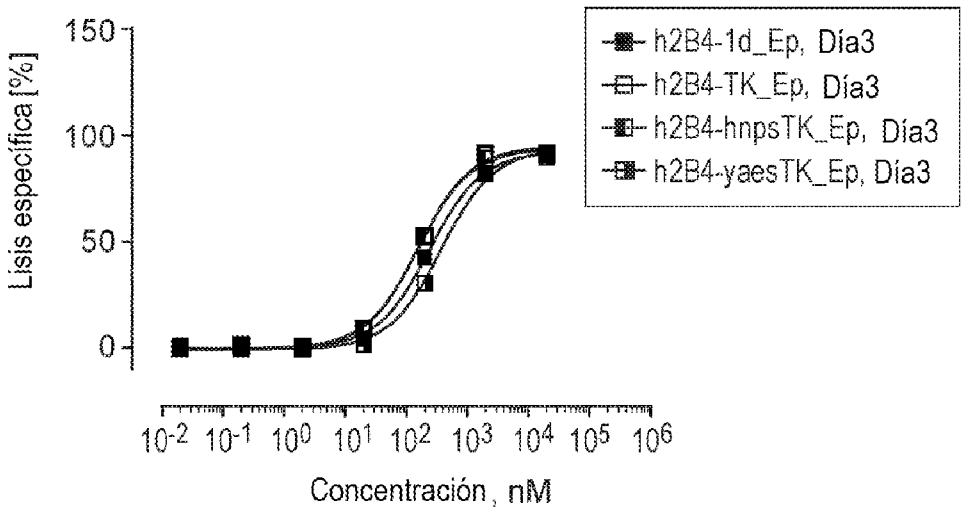


Figura 11C

Variantes CD3: h2B4 vs. 25A8; Día 2
PanT como Efectora/ SW480 como Diana

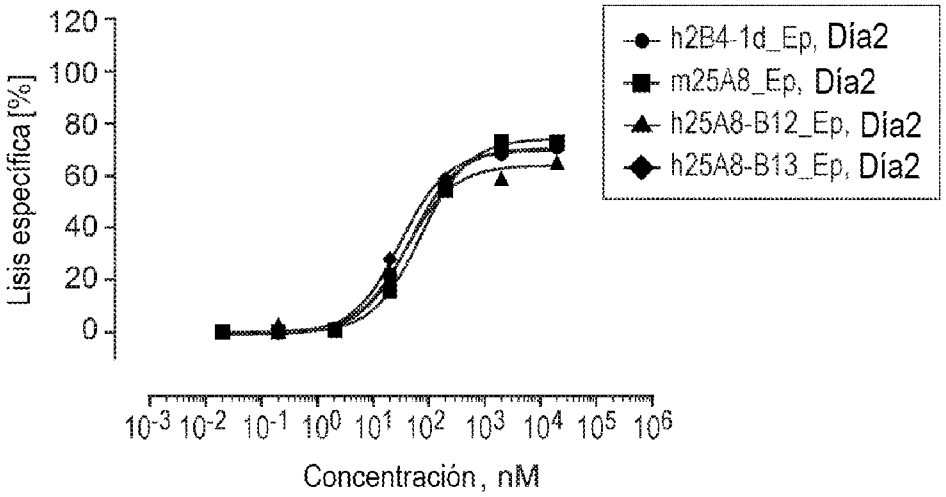


Figura 11D

Variantes CD3: h2B4 vs. 25A8; Día 3
PanT como Efectora/ SW480 como Diana

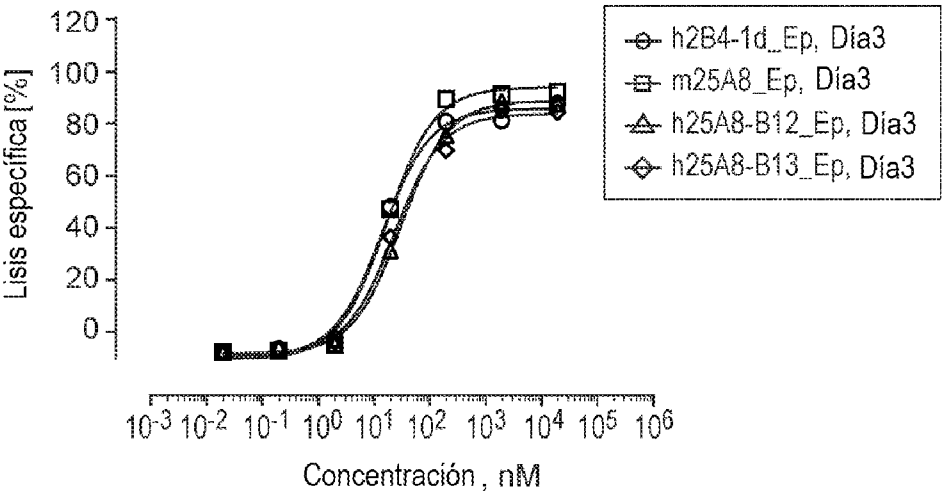


Figura 12

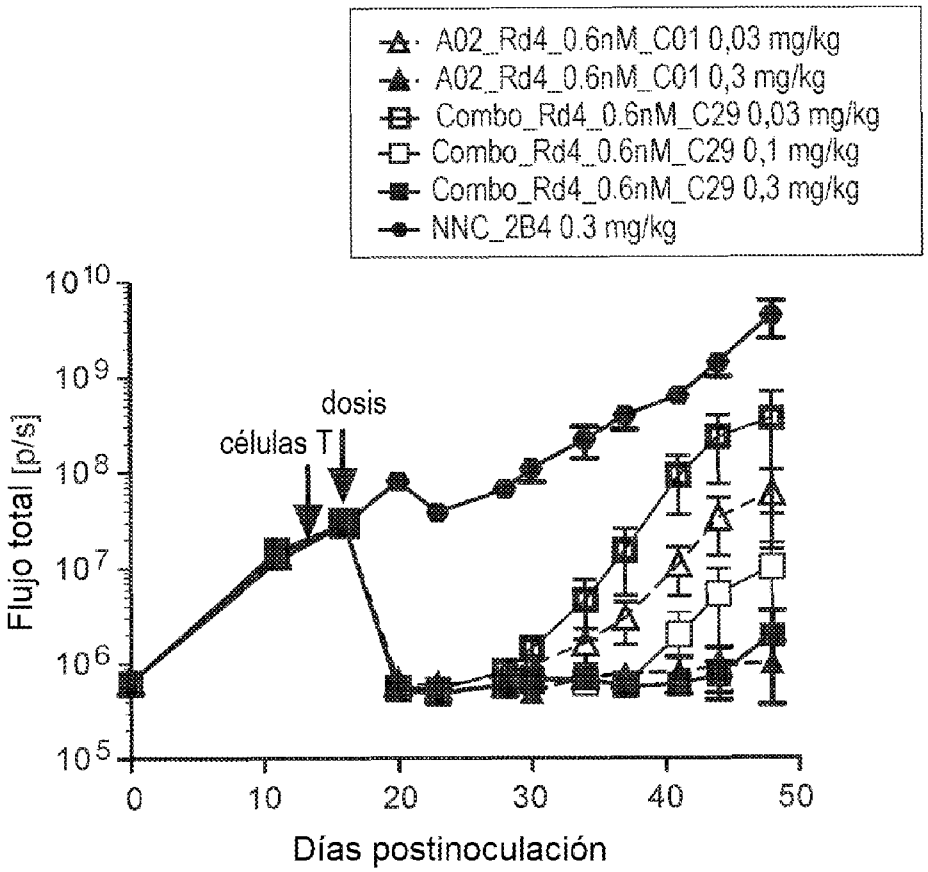

A02_Rd4_0.6nM_C01 0,03 mg/kg
A02_Rd4_0.6nM_C01 0,3 mg/kg
Combo_Rd4_0.6nM_C29 0,03 mg/kg
Combo_Rd4_0.6nM_C29 0,1 mg/kg
Combo_Rd4_0.6nM_C29 0,3 mg/kg
NNC_2B4 0.3 mg/kg
Flujo total [p/s]
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
células T
dosis
0
10
20
30
40
50
Días postinoculación

Figura 13

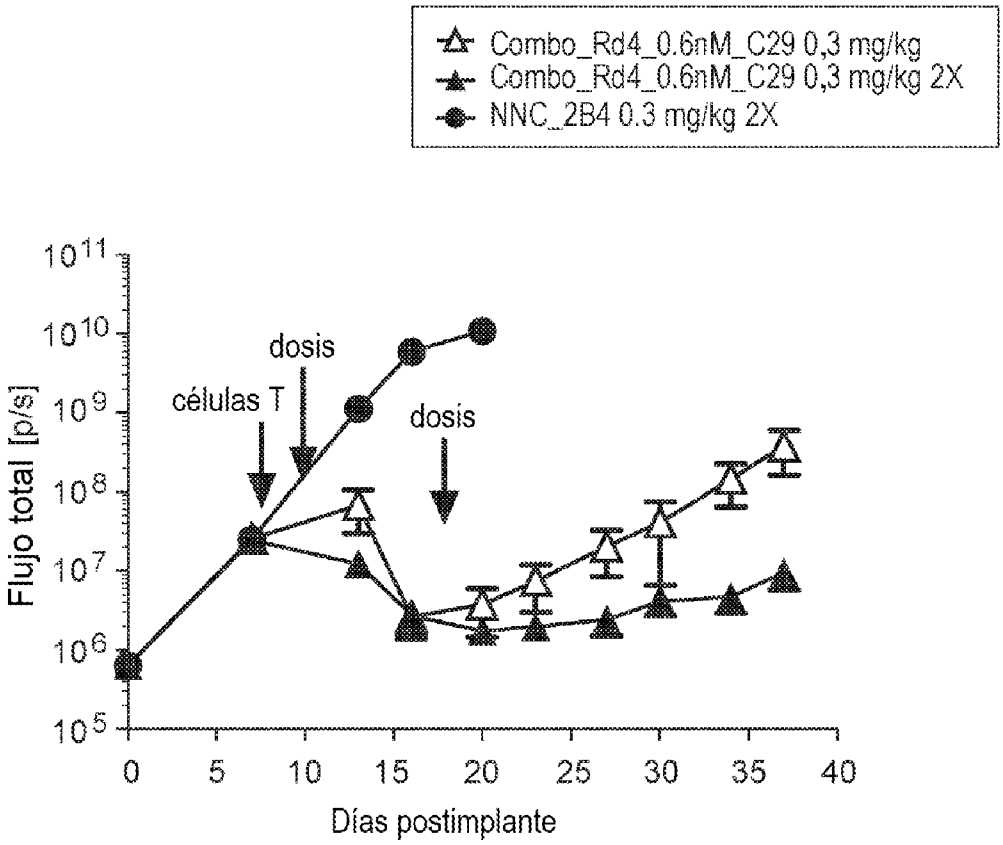

Combo_Rd4_0.6nM_C29 0,3 mg/kg
Combo_Rd4_0.6nM_C29 0,3 mg/kg 2X
NNC_2B4 0.3 mg/kg 2X
Flujo total [p/s]
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
células T
dosis
dosis
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Días postimplante

Figura 14

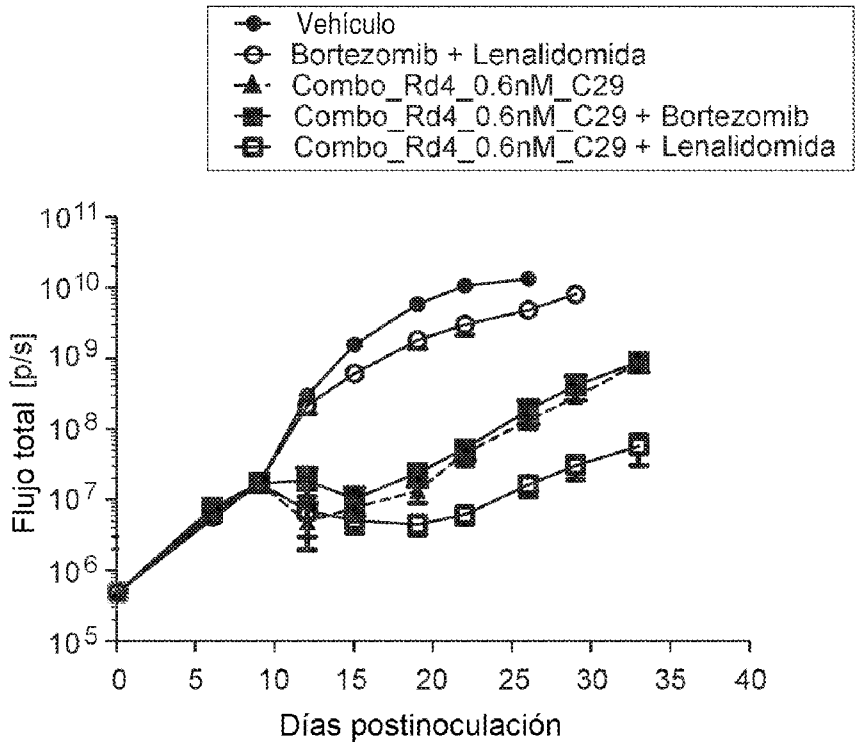
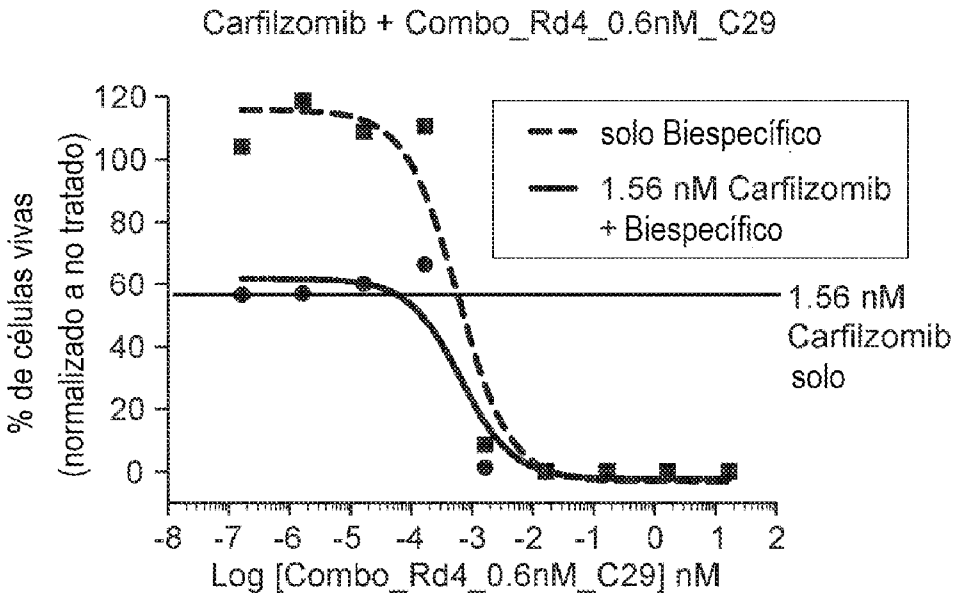

Vehículo
Bortezomib + Lenalidomida
Combo_Rd4_0.6nM_C29
Combo_Rd4_0.6nM_C29 + Bortezomib
Combo_Rd4_0.6nM_C29 + Lenalidomida
Flujo total [p/s]
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Días postinoculación

Figura 15A



solo Biespecífico

Figura 15B

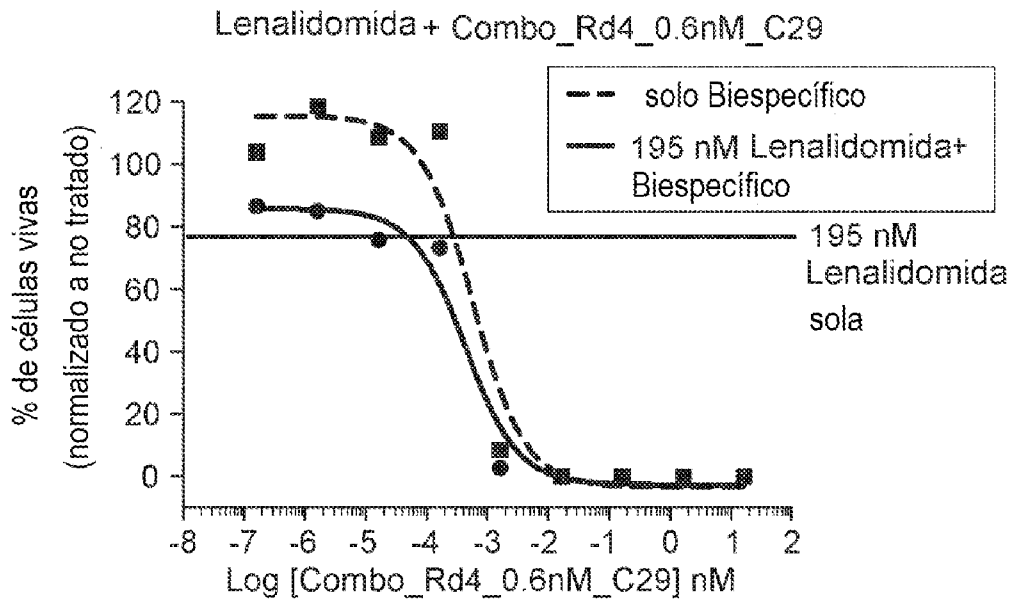


Figura 15C

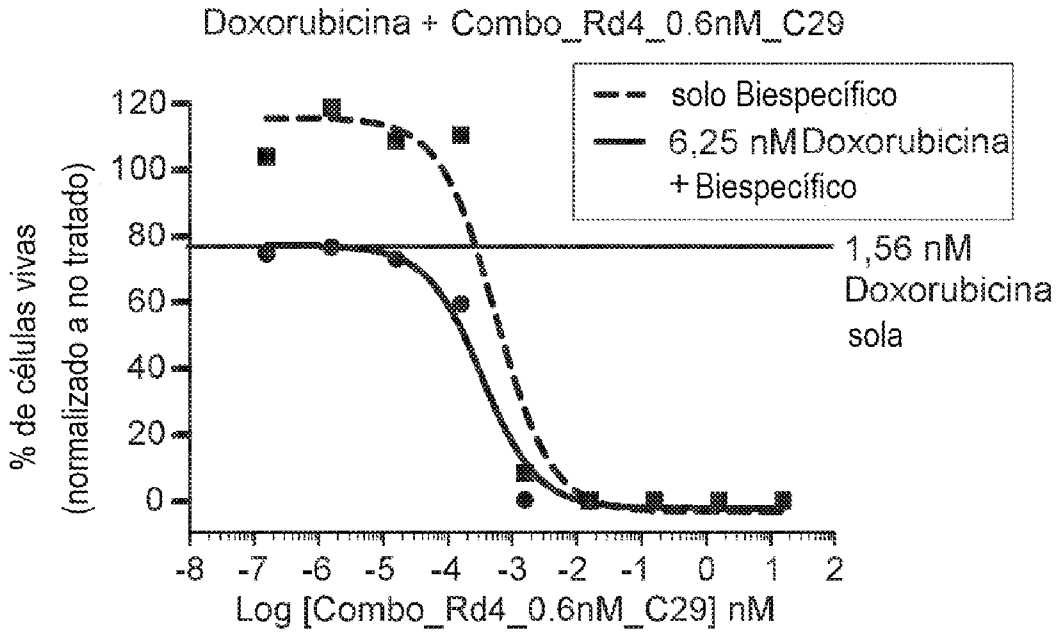

Doxorubicina + Combo_Rd4_0.6nM_C29
solo Biespecífico
6,25 nM Doxorubicina + Biespecífico
1,56 nM Doxorubicina sola
% de células vivas (normalizado a no tratado)
120
100
80
60
40
20
0
-8
-7
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log [Combo_Rd4_0.6nM_C29] nM

Figura 16

KMS12BM

