

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 285**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2019 PCT/US2019/042447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2020 WO20018820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2019 E 19749096 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3823664**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.07.2018 US 201862700596 P

26.10.2018 US 201862750968 P

17.01.2019 US 201962793645 P

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

02.04.2025

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.00%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

SMITH, ERIC;

OLSON, KARA;

DELFINO, FRANK;

DILILLO, DAVID;

KIRSHNER, JESSICA;

SINESHCHEKOVA, OLGA y

ZHANG, QIAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 3 010 285 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno biespecíficas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) que se unen al antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA, por sus siglas en inglés) y a CD3, y a métodos de uso de las mismas.

10

Antecedentes

El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), también conocido como TNFRSF17 o CD269, es una proteína transmembrana de tipo III que carece de un péptido señal y que contiene un dominio extracelular rico en cisteína. El BCMA, junto con proteínas estrechamente relacionadas, promueve la supervivencia de los linfocitos B en distintas fases del desarrollo. El BCMA se expresa exclusivamente en células del linaje de linfocitos B, particularmente en la región interfolicular del centro germinal así como en plasmablastos y células plasmáticas diferenciadas. El BCMA se induce selectivamente durante la diferenciación de las células plasmáticas y es necesario para la supervivencia óptima de las células plasmáticas de larga vida en la médula ósea. En el mieloma múltiple, el BCMA se expresa ampliamente en células plasmáticas neoplásicas a niveles elevados, y la expresión del BCMA aumenta con la progresión de células normales a mieloma múltiple activo. El BCMA también se expresa en otras neoplasias malignas de linfocitos B, incluyendo macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de linfocitos B grandes. Tai *et al.*, *Immunotherapy*, 7(11):1187-1199, 2015.

15

20

25

30

35

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

40

El documento WO 2017/031104 divulga anticuerpos anti-BCMA, moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a BCMA y a CD3, y sus usos. El documento WO 2014/047231 divulga anticuerpos anti-CD3, moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a CD3 y a CD20, y sus usos. El documento WO 2018/067331 divulga anticuerpos biespecíficos anti-MUC16-CD3 y conjugados de fármacos NTI-MUC16.

Las moléculas de unión a antígeno que se dirigen a BCMA, incluyendo las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen tanto a BCMA como a CD3, serían útiles en entornos terapéuticos en los que se desee un direccionamiento específico y la destrucción mediada por linfocitos T de células que expresan BCMA.

45 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, que comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) humano que comprende dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 68, 70, 72, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 92, 94, 96, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88. En algunos casos, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

60

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, que comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) humano que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 68, 70, 72, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende los dominios HCDR1,

65

HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 100, 102, 104, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88. En algunos casos, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

Cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas comentadas anteriormente o en el presente documento puede ser un anticuerpo biespecífico. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de cadena pesada de IgG humana. En algunos casos, la región constante de cadena pesada de IgG humana es el isotipo IgG1. En algunos casos, la región constante de cadena pesada de IgG humana es el isotipo IgG4. En diversas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una bisagra quimérica que reduce la unión al receptor Fc γ en relación con una bisagra de tipo silvestre del mismo isotipo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) de la invención, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, para su uso en un método de inhibición del crecimiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, o la composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica. En algunos casos, el tumor de células plasmáticas es el mieloma múltiple. En algunos casos, el método comprende además la administración de un segundo agente terapéutico, o régimen terapéutico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende un agente antitumoral (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, incluyendo melfalán, vincristina (Oncovin), ciclofosfamida (Cytosan), etopósido (VP-16), doxorubicina (Adriamicina), doxorubicina liposomal (Doxil), obendamustina (Treanda), o cualquier otro que se sepa que es eficaz en el tratamiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto). En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende esteroides. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende terapias dirigidas que incluyen talidomida, lenalidomida y bortezomib, que son terapias aprobadas para tratar a pacientes recién diagnosticados. La lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, panobinostat, ixazomib, elotuzumab y daratumumab, son ejemplos de un segundo agente terapéutico eficaz para tratar el mieloma recurrente. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un régimen que comprende radioterapia o un trasplante de células madre. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un agente inmunomodulador. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor del proteosoma, incluyendo bortezomib (Velcade), carfilzomib (Kyprolis), ixazomib (Ninlaro). En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor de histona desacetilasa tal como panobinostat (Farydak). En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un anticuerpo monoclonal, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor de punto de control, o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padezca mieloma múltiple, u otra neoplasia maligna de linfocitos B que expresa BCMA, donde el método comprende administrar al sujeto la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada o la composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica. En algunos casos, la neoplasia maligna de linfocitos B que expresa BCMA se selecciona del grupo que consiste en macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmocítico y linfoma de Hodgkin. En algunos casos, el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende un agente antitumoral (un agente quimioterapéutico), alquilantes de ADN, inmunomoduladores, inhibidores del proteosoma, radioterapia con inhibidores de la histona desacetilasa, un trasplante de células madre, un inmunomodulador, un anticuerpo monoclonal que interactúa con un antígeno expresado en la superficie de la célula tumoral, un anticuerpo monoclonal distinto de los descritos en el presente documento, que puede interactuar con un antígeno diferente en la superficie de las células plasmáticas, un anticuerpo biespecífico, que tiene un brazo que se une a un antígeno en la superficie de la célula tumoral y el otro brazo se une a un antígeno en un

- linfocito T, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor del punto de control, por ejemplo, uno que se dirige a, PD-1 o CTLA-4, o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-1, tales como pembrolizumab (Keytruda), nivolumab (Opdivo) o cemiplimab (REGN2810). En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-L1, tales como atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio) o Durvalumab (Imfinzi)). En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de CTLA-4, tales como ipilimumab (Yervoy). Anteriormente se han descrito otras combinaciones que pueden utilizarse junto con un anticuerpo de la invención.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece un tumor que expresa BCMA, en donde el método comprende la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, o la composición farmacéutica, al sujeto junto con un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti-PD-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es cemiplimab (REGN2810). En diversas realizaciones, la combinación de molécula de unión a antígeno biespecífica anti-BCMA x anti-CD3 (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) y un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1) produce un efecto terapéutico sinérgico en el tratamiento de tumores que expresan BCMA.
- Otros aspectos resultarán evidentes tras la revisión de la descripción detallada adjunta.

Breve descripción de los dibujos

- Las figuras 1 y 2 ilustran la inhibición tumoral profiláctica dependiente de la dosis de células tumorales de mieloma múltiple humano NCI-H929 que expresan BCMA *in vivo* mediante los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 y REGN5459, respectivamente. Las células NCI-H929 expresan altos niveles de BCMA.
- Las Figuras 3 y 4 ilustran la inhibición tumoral dependiente de la dosis terapéutica de células tumorales de mieloma múltiple humano NCI-H929 que expresan BCMA establecidas *in vivo* mediante los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 y REGN5459, respectivamente. Las células NCI-H929 expresan altos niveles de BCMA.
- Las figuras 5 y 6 ilustran la inhibición tumoral profiláctica dependiente de la dosis de células tumorales de mieloma múltiple humano MOLT-8 que expresan BCMA *in vivo* mediante los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 y REGN5459, respectivamente. Las células MOLT-8 expresan niveles moderados de BCMA.
- La Figura 7 ilustra una reducción terapéutica de la carga tumoral establecida de células tumorales de mieloma múltiple humano OPM-2 que expresan BCMA *in vivo* mediante los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 REGN5458 y REGN5459, en relación con los controles. Las células OPM-2 expresan niveles bajos de BCMA.

Descripción detallada

- La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar del valor indicado en no más de un 1%. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Definiciones

- La expresión "CD3", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno que se expresa en linfocitos T como parte del receptor multimolecular de linfocitos T (TCR) y que consiste en un homodímero o heterodímero formado a partir de la asociación de dos de las cuatro cadenas receptoras: CD3-épsilon, CD3-delta, CD3-zeta y CD3-gamma. CD3-épsilon humano comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 116; CD3-delta humano comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 117; CD3-delta humano comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 118; CD3-gamma humano comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO 119. Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteína en el presente documento pretenden referirse a la versión humana de la proteína, polipéptido o fragmento de proteína respectiva a menos que se especifique explícitamente como de una especie no humana. Por tanto, la expresión "CD3" significa CD3 humano a menos que se especifique que proviene de una especie no humana, por ejemplo, "CD3 de ratón", "CD3 de mono", etc.

- Tal como se usa en el presente documento, "un anticuerpo que se une a CD3" o un "anticuerpo anti-CD3" incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente una subunidad CD3 única (por ejemplo, épsilon, delta, gamma o zeta), así como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente un complejo dimérico de dos subunidades CD3 (por ejemplo, dímeros de

CD3 gamma/épsilon, delta/épsilon y zeta/zeta). Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden unirse a CD3 soluble y/o CD3 expresado en la superficie celular. CD3 soluble incluye proteínas CD3 naturales, así como variantes de proteínas CD3 recombinantes como, por ejemplo, construcciones CD3 monoméricas y díméricas, que carecen de un dominio transmembrana o que no están asociadas con una membrana celular.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "CD3 expresado en la superficie celular" significa una o más proteínas CD3 que se expresan en la superficie de una célula *in vitro* o *in vivo*, de modo que al menos una parte de una proteína CD3 está expuesta al lado extracelular de la membrana celular y es accesible a una parte de unión a antígeno de un anticuerpo. "CD3 expresado en la superficie celular" incluye proteínas CD3 contenidas dentro del
 10 contexto de un receptor de linfocitos T funcional en la membrana de una célula. La expresión "CD3 expresado en la superficie celular" incluye la proteína CD3 expresada como parte de un homodímero o un heterodímero en la superficie de una célula (por ejemplo, dímeros de CD3 gamma/épsilon, delta/épsilon y zeta/zeta). La expresión, "CD3 expresado en la superficie celular" también incluye una cadena de CD3 (por ejemplo, CD3-épsilon, CD3-delta o CD3-gamma) que se expresa por sí misma, sin otros tipos de cadenas de CD3, en la superficie de una célula. Un "CD3 expresado
 15 en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína CD3 expresada en la superficie de una célula que normalmente expresa la proteína CD3. Como alternativa, "CD3 expresado en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína CD3 expresada en la superficie de una célula que normalmente no expresa CD3 humano en su superficie pero que se ha manipulado de manera artificial para expresar CD3 en su superficie.

20 La expresión "BCMA", tal como se usa en el presente documento, se refiere al antígeno de maduración de linfocitos B. El BCMA (también conocido como TNFRSF17 y CD269) es una proteína de la superficie celular expresada en células plasmáticas neoplásicas y desempeña un papel fundamental en la regulación de la maduración de los linfocitos B y en la diferenciación en células plasmáticas productoras de inmunoglobulina. La secuencia de aminoácidos de BCMA humano se muestra en la SEQ ID NO: 115, y también se puede encontrar en el número de registro de GenBank
 25 NP_001183.2.

Tal como se usa en el presente documento, "un anticuerpo que se une a BCMA" o un "anticuerpo anti-BCMA" incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente a BCMA.

30 La expresión "molécula de unión a antígeno" incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une
 35 específicamente a o interacciona con un antígeno particular (por ejemplo, BCMA o CD3). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de los mismos (por ejemplo, IgM). El término "anticuerpo" también incluye moléculas de inmunoglobulina que constan de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada
 40 comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones
 45 determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining regions*), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, del inglés *framework regions*). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En distintas realizaciones de la invención, las FR del anticuerpo anti-BCMA o anticuerpo anti-CD3 (o parte de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las
 50 secuencias de la estirpe germinal humana o pueden estar modificadas de forma natural o artificial. Una secuencia de aminoácidos consenso puede definirse basándose en un análisis en paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de
 55 unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se usa en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, mediante cualquier técnica convencional adecuada, tal como digestión proteolítica o técnicas recombinantes de ingeniería genética que implican la
 60 manipulación y expresión de ADN que codifica los dominios variables y, opcionalmente, los constantes, de un anticuerpo. Dicho ADN se conoce y/o se puede adquirir fácilmente, por ejemplo, en fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, fagotecas de anticuerpos) o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar,
 65 añadir o eliminar aminoácidos, etc.

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

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

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

Como ocurre con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser mono-específicos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno diferente o a un epítipo distinto en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ilustrativos que se divulgan en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas rutinarias disponibles en la materia.

Los anticuerpos de la presente invención pueden actuar mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). "Citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo de la invención en presencia del complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR, del inglés *Fc receptors*) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK, del inglés *Natural Killer*), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y de ese modo da lugar a la lisis de la célula diana. La CDC y la CCDA pueden medirse usando ensayos que se conocen bien y están disponibles en la técnica. (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.500.362 y 5.821.337, y Clynes *et al.*, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 95:652-656). La región constante de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo de fijar el complemento y mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por tanto, el isotipo de un anticuerpo puede seleccionarse basándose en si se desea que el anticuerpo medie la citotoxicidad.

En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 de la invención son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR procedentes de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se hayan injertado en secuencias estructurales humanas.

Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas realizaciones, ser anticuerpos humanos recombinantes. La

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

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que se asocian a la heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de aproximadamente 150-160 kDa en donde los dímeros se mantienen juntos mediante un enlace disulfuro intercatenario de la cadena pesada. En una segunda forma, los dímeros no están unidos a través de enlaces disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta por una cadena ligera y pesada acopladas covalentemente (semianticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de la purificación por afinidad.

La frecuencia de aparición de la segunda forma en diferentes isotipos de IgG inalterada se debe, aunque no de forma limitativa, a diferencias estructurales asociadas al isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un único aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology* 30:105) hasta los niveles normalmente observados usando una bisagra de IgG1 humana. La presente invención abarca anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la región bisagra, la región C_{H2} o C_{H3}, que puede ser deseable, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o eliminado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en donde el anticuerpo existe de forma natural o se produce de forma natural, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente invención. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con determinadas realizaciones, un anticuerpo aislado puede carecer sustancialmente de otro material celular y/o agentes químicos.

La presente divulgación también incluye anticuerpos de un brazo que se unen a BCMA. Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo de un brazo" significa una molécula de unión a antígeno que comprende una única cadena pesada de anticuerpo y una única cadena ligera de anticuerpo. Los anticuerpos de un brazo pueden comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1.

Los anticuerpos anti-BCMA o anti-BCMA x anti-CD3 divulgados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la estirpe germinal correspondientes de las que derivan los anticuerpos. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos que se divulgan en el presente documento con secuencias de la estirpe germinal disponibles en, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que proceden de cualquiera de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la estirpe germinal de la que procede el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la estirpe germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservativa del resto o restos de la estirpe germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se denominan en conjunto en el presente documento "mutaciones de la estirpe germinal"). Un experto en la materia, partiendo de las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera desveladas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos que comprendan una o más mutaciones individuales de la estirpe germinal o combinaciones de las mismas. En determinados aspectos, todos los restos de la región marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se retromutan a los restos encontrados en la secuencia de la estirpe germinal original de la que se obtuvo el anticuerpo. En otros aspectos, únicamente determinados restos se retromutan a la secuencia de estirpe germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los 8 primeros aminoácidos de FR1 o dentro de los 8 últimos aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros aspectos, uno o más de entre

el resto o los restos de la región marco conservada y/o de la CDR están mutados al resto o los restos correspondientes de una secuencia de la estirpe germinal diferente (es decir, una secuencia de la estirpe germinal diferente que es diferente de la secuencia de la estirpe germinal de la que derivó originariamente el anticuerpo). Adicionalmente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la estirpe germinal dentro de las regiones marco y/o las CDR, por ejemplo, en donde determinados restos individuales mutan al resto correspondiente de una secuencia de la estirpe germinal particular, mientras que otros restos determinados, que difieren de los de la secuencia de la estirpe germinal original, se mantienen o mutan al resto correspondiente de una secuencia de estirpe germinal distinta. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la estirpe germinal pueden probarse fácilmente con respecto a una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están abarcados en la presente divulgación.

La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-BCMA o anti-BCMA x anti-CD3 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR divulgadas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-BCMA o anti-BCMA x anti-CD3 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones conservativas de aminoácidos respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR expuestas en las Tablas 1 y 3 del presente documento, o los anticuerpos anti-CD3 divulgados en los documentos WO 2014/047231 o WO 2017/053856.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por tanto, distintos anticuerpos pueden unirse a distintas áreas de un antígeno y pueden tener distintos efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce mediante aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En una determinada circunstancia, un epítipo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea de forma óptima con inserciones o supresiones de nucleótidos adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente un 95 % y, más preferentemente, en al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, según se mide mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tales como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinados casos, codificar un polipéptido que tenga la misma secuencia de aminoácidos o una sustancialmente similar que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Aplicada a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco predeterminadas, comparten al menos el 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es aquella en la que un resto de aminoácido está sustituido con otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre que son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 desvelada en Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se mide normalmente con un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas empareja

secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diferentes sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit, que pueden utilizarse con los parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de distintas especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) citado anteriormente). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

15 Mutaciones de la estirpe germinal

Los anticuerpos anti-CD3 divulgados en el presente documento comprenden una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco de los dominios variables de cadena pesada en comparación con las correspondientes secuencias de estirpe germinal de las que se derivaron los anticuerpos.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que proceden de cualquiera de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos de una o más regiones marco están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la estirpe germinal de la que procede el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la estirpe germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservativa del resto o restos de la estirpe germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se denominan en el presente documento colectivamente "mutaciones de la estirpe germinal") y tienen una unión débil o no detectable a un antígeno CD3.

Adicionalmente, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la estirpe germinal dentro de las regiones marco, por ejemplo, en donde determinados restos individuales mutan al resto correspondiente de una secuencia de la estirpe germinal particular, mientras que otros restos determinados, que difieren de los de la secuencia de la estirpe germinal original, se mantienen o mutan al resto correspondiente de una secuencia de estirpe germinal distinta. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la estirpe germinal pueden probarse con respecto a una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión débil o reducida, propiedades farmacocinéticas mejoradas o potenciadas, inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general dada la orientación de la presente divulgación están incluidos dentro de la presente divulgación.

La presente también se refiere a moléculas de unión a antígeno que comprenden un dominio de unión a antígeno con una secuencia de aminoácidos de HCVR que es sustancialmente idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR divulgadas en el presente documento, mientras se mantiene o mejora la afinidad débil deseada por el antígeno CD3. La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se hace referencia a una secuencia de aminoácidos significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco predeterminadas, comparten al menos el 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se mide normalmente con un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diferentes sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservativas de aminoácidos. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit, que pueden utilizarse con los parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de distintas especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) citado anteriormente). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul *et al.*

(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Propiedades de unión de los anticuerpos

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo, inmunoglobulina, fragmento de unión a anticuerpo, o proteína que contiene Fc a cualquiera, por ejemplo, un antígeno predeterminado, tal como una proteína de la superficie celular o un fragmento de la misma, se refiere normalmente a una interacción o asociación entre un mínimo de dos entidades o estructuras moleculares, tal como una interacción de anticuerpo y antígeno.

10 Por ejemplo, la afinidad de unión corresponde normalmente a un valor K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-8} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-9} M o menor cuando se determina, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) en un instrumento BIAcore 3000 que utiliza el antígeno como ligando y el anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc como analito (o antiligando). Las estrategias de unión basadas en células, tales como los análisis de unión de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, *Fluorescent-Activated Cell Sorting*), también se utilizan de forma rutinaria, y los datos de FACS se correlacionan bien con otros métodos, tales como la unión por competición de radioligandos y la SPR (Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, *et al. J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68-77).

20 Por consiguiente, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno de la invención se une al antígeno predeterminado o molécula de la superficie celular (receptor) que tiene una afinidad correspondiente a un valor de K_D que es al menos diez veces inferior a su afinidad por unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína). Según la presente invención, la afinidad de un anticuerpo correspondiente a un valor de K_D que es igual o menos de diez veces inferior a un antígeno no específico puede considerarse unión no detectable, sin embargo, dicho anticuerpo puede emparejarse con un segundo brazo de unión a antígeno para la producción de un anticuerpo biespecífico de la invención.

30 El término " K_D "(M) se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de anticuerpo y antígeno particular, o la constante de equilibrio de disociación de un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo que se une a un antígeno. Existe una relación inversa entre la K_D y la afinidad de unión, por lo que cuanto menor es el valor de K_D , mayor, es decir, más fuerte, será la afinidad. Por tanto, las expresiones "afinidad mayor" o "afinidad más fuerte" se refieren a una mayor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D menor y, por el contrario, las expresiones "afinidad menor" o "afinidad más débil" se refieren a una menor capacidad para formar una interacción y, por lo tanto, un valor de K_D mayor. En algunas circunstancias, una mayor afinidad de unión (o K_D) de una molécula particular (por ejemplo, anticuerpo) a su molécula asociada interactiva (por ejemplo, antígeno X) en comparación con la afinidad de unión de la molécula (por ejemplo, anticuerpo) a otra molécula asociada interactiva (por ejemplo, antígeno Y) puede expresarse como una relación de unión determinada mediante la división del valor de K_D más elevado (afinidad menor, o más débil) entre el valor de K_D más bajo (afinidad mayor, o más fuerte), por ejemplo, expresada como afinidad de unión 5 veces o 10 veces superior, según sea el caso.

45 El término " k_d "(s⁻¹ o 1/s) se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción de anticuerpo y antígeno particular, o la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo. Dicho valor también se conoce como valor K_{off} .

El término " k_a " (M⁻¹ × s⁻¹ o 1/M) se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción de anticuerpo y antígeno particular, o la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo.

50 El término " K_a "(M⁻¹ o 1/M) se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción de anticuerpo y antígeno particular, o la constante de equilibrio de asociación de un anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo. La constante de equilibrio de asociación se obtiene dividiendo la k_a entre la k_d .

55 El término "CE50" o "CE₅₀" se refiere a la concentración eficaz semimáxima, que incluye la concentración de un anticuerpo que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición específico. La CE₅₀ representa esencialmente la concentración de un anticuerpo donde se observa el 50 % de su efecto máximo. En determinadas realizaciones, el valor de CE₅₀ es igual a la concentración de un anticuerpo de la invención que proporciona una unión semimáxima a las células que expresan CD3 o antígeno asociado a tumores (por ejemplo, BCMA), según se determina mediante, por ejemplo, un análisis de unión de FACS. Por tanto, se observa una unión reducida o más débil con un aumento de la CE₅₀, o valor de concentración eficaz semimáxima.

60 En una realización, la unión disminuida puede definirse como un aumento de la concentración de anticuerpos CE₅₀ que permite la unión a la cantidad semimáxima de células diana.

65 En otra realización, el valor de CE₅₀ representa la concentración de un anticuerpo de la invención que provoca el agotamiento semimáximo de las células diana mediante la actividad citotóxica de los linfocitos T. Por tanto, se observa un aumento de la actividad citotóxica (por ejemplo, destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T) con una

disminución de la CE₅₀, o el valor de concentración eficaz semimáxima.

Moléculas de unión a antígeno biespecíficas

- 5 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Los anticuerpos anti-BCMA x anti-CD3 de la presente invención pueden unirse a o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse de forma funcional (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda especificidad de unión o especificidad de unión adicional.
- 10
- 15 El uso de la expresión "anticuerpo anti-CD3" o "anticuerpo anti-BCMA" en el presente documento pretende incluir tanto anticuerpos monoespecíficos anti-CD3 o anti-BCMA como anticuerpos biespecíficos que comprenden un brazo de unión a CD3 y un brazo de unión a BCMA. La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos como se definen en las reivindicaciones en donde un brazo de una inmunoglobulina se une a CD3 humano, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico del BCMA humano.
- 20
- En determinados casos, el brazo de unión a CD3 se une a CD3 humano e induce la activación de linfocitos T humanos. En determinados casos, el brazo de unión a CD3 se une de forma débil al CD3 humano e induce la activación de los linfocitos T humanos. En otros casos, el brazo de unión a CD3 se une de forma débil a CD3 humano e induce la destrucción de células que expresan antígenos asociados a tumores en el contexto de un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. En otros casos, el brazo de unión a CD3 se une o se asocia de forma débil con CD3 humano y de macaco (mono) cangrejero, sin embargo, la interacción de unión no es detectable mediante ensayos *in vitro* conocidos en la materia. El brazo de unión a BCMA puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1 en el presente documento.
- 25
- 30 La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas como las definidas en las reivindicaciones que se unen específicamente a CD3 y BCMA. En el presente documento dichas moléculas pueden denominarse, por ejemplo, "anti-BCMA x anti-CD3" o "anti-CD3/anti-BCMA" o "anti-CD3xBCMA" o "CD3xBCMA", u otra terminología similar (por ejemplo, anti-BCMA/anti-CD3).
- 35 El término "BCMA", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína BCMA humana a menos que se especifique que proviene de una especie no humana (por ejemplo, "BCMA de ratón", "BCMA de mono", etc.). La proteína BCMA humana tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 115.
- 40 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas mencionadas anteriormente que se unen específicamente a CD3 y a BCMA pueden comprender una molécula de unión a antígeno anti-CD3 que se une a CD3 con una afinidad de unión débil, tal como la que presenta una K_D superior a aproximadamente 40 nM, medida mediante un ensayo de unión por afinidad *in vitro*.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende o consiste en al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que sola, o junto con una o más CDR y/o regiones marco (FR) adicionales, se une de manera específica a un determinado antígeno. En determinados aspectos, una molécula de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo, como se definen esos términos en otras partes en el presente documento.
- 50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno biespecífica" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno. Cada dominio de unión a antígeno dentro de la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende al menos una CDR que sola, o junto con una o más CDR y/o FR adicionales, se une de manera específica a un determinado antígeno. En el contexto de la presente invención, el primer dominio de unión a antígeno se une específicamente a un primer antígeno (BCMA), y el segundo dominio de unión a antígeno se une específicamente a un segundo antígeno distinto (CD3).
- 55
- En determinadas realizaciones ilustrativas de la presente invención, la molécula de unión a antígeno biespecífica es un anticuerpo biespecífico. Cada dominio de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada (HCVR) y un dominio variable de cadena ligera (LCVR). En el contexto de una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un primer y un segundo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo "D1" y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo "D2". Por tanto, en el presente documento las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden denominarse D1-HCDR1, D1-HCDR2 y D1-HCDR3; y, en el presente documento, las CDR del segundo dominio de unión a antígeno pueden denominarse D2-HCDR1, D2-HCDR2 e D2-HCDR3.
- 60
- 65

En determinados aspectos ilustrativos de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende: (a) tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66; y (b) tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82. En la invención, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:68, una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70 y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72. En la invención, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84, una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88. En algunos casos, el primer dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

En determinados aspectos ilustrativos de la divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende un segundo dominio de unión a antígeno que comprende: (a) tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 98; y (b) tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:82. En la invención, el segundo dominio de unión a antígeno comprende una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:84, una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86 y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88. En la invención, el segundo dominio de unión a antígeno comprende: (a) los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 92, 94, 96; y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88; o (b) los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 100, 102, 104; y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88. En algunos casos, el segundo dominio de unión a antígeno comprende: (a) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; o (b) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 68, 70, 72, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 92, 94, 96, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88. En algunos casos, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

En otra realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 68, 70, 72, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 100, 102, 104, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88. En algunos casos, la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada comprende: (a) un primer dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; y (b) un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98, y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas analizadas anteriormente o en el presente documento pueden ser anticuerpos biespecíficos. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de cadena pesada de IgG humana. En algunos casos, la región constante de cadena pesada de IgG humana es el isotipo IgG1. En algunos casos, la región constante de cadena pesada de IgG humana es el isotipo IgG4. En diversas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una bisagra quimérica que reduce la unión al receptor Fcy en relación con una

bisagra de tipo silvestre del mismo isotipo.

El primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden estar conectados directa o indirectamente entre sí para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente invención. Como alternativa, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden estar unidos a un dominio de multimerización separado. La asociación de un dominio de multimerización con otro dominio de multimerización facilita la asociación entre los dos dominios de unión a antígeno, formando de este modo una molécula de unión a antígeno biespecífica. Tal como se usa en el presente documento, un "dominio de multimerización" es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido o aminoácido que tiene la capacidad de asociarse con un segundo dominio de multimerización de la misma estructura o constitución o similar. Por ejemplo, un dominio multimerizante puede ser un polipéptido que comprende un dominio de inmunoglobulina C_H3. Un ejemplo no limitante de un componente de multimerización es una porción Fc de una inmunoglobulina (que comprende un dominio C_H2-C_H3), por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo.

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

En determinadas realizaciones, el dominio multimerizante es un fragmento Fc o una secuencia de aminoácidos de 1 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud que contiene al menos un resto de cisteína. En otras realizaciones, el dominio de multimerización es un resto de cisteína o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios de multimerización incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo de bucle de hélice o un motivo de hélice superenrollada.

Puede utilizarse cualquier formato o tecnología de anticuerpo biespecífico para preparar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una primera especificidad de unión a antígeno puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica. Otros formatos biespecíficos ilustrativos específicos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o de diacuerpo, fusiones IgGscFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, cuadro, botones en ojales, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con "botones en ojales", etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED) cuerpo, cremallera de leucina, Duocuerpo, IgG1/IgG2, Fab de acción doble (DAF)-IgG y formatos biespecíficos de Mab² (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, 2012, mAbs 4:6, 1-11, y las referencias citadas en el mismo, para una revisión de los formatos anteriores).

En el contexto de moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención, los dominios de multimerización, por ejemplo, dominios Fc, pueden comprender uno o más cambios de aminoácidos (por ejemplo, inserciones, deleciones o sustituciones) en comparación con la versión natural de tipo silvestre del dominio Fc. Por ejemplo, la invención incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden una o más modificaciones en el dominio Fc produciendo un dominio Fc modificado que tiene una interacción de unión modificada (por ejemplo, mejorada o disminuida) entre Fc y FcRn. En una realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende una modificación en una región C_H2 o C_H3, en donde la modificación aumenta la afinidad del dominio Fc a FcRn en un entorno ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Los ejemplos no limitantes de dichas modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una realización, la modificación comprende una modificación en 428L (por ejemplo, M428L) y una en 434S (por ejemplo, N434S); una modificación en 428L, 259I (por ejemplo, V259I), y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación en 433K (por ejemplo, H433K) y una en 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación en 252, 254, y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación en 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación en 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

La presente invención también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio C_H3 y un segundo dominio C_H3 de Ig, en donde el primer y el segundo dominio C_H3 de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una realización, el primer dominio C_H3 de Ig está unido a proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a proteína A, tal como una modificación en H95R (según la numeración de exones IMGT; H435R según la numeración EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación en Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.586.713. Otras modificaciones

adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG4.

5 En determinadas realizaciones, el dominio Fc puede ser quimérico, que combina secuencias de Fc procedentes de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc quimérico puede comprender parte o la totalidad de una secuencia C_H2 derivada de una región C_H2 de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y parte o toda una secuencia C_H3 derivada de una IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Un dominio Fc quimérico también puede
10 contener una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de "bisagra superior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, junto con una secuencia de "bisagra inferior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana. Un ejemplo particular de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno establecidas en el presente documento comprende, desde el extremo N al extremo C: [C_H1 de IgG4]
15 - [Bisagra superior de IgG4] - [Bisagra inferior de IgG2] - [CH2 de IgG4] - [CH3 de IgG4]. Otro ejemplo de un dominio Fc quimérico que se puede incluir en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno establecidas en el presente documento comprende, desde el extremo N al extremo C: [C_H1 de IgG1] - [Bisagra superior de IgG1] - [Bisagra inferior de IgG2] - [CH2 de IgG4] - [CH3 de IgG1]. Estos y otros ejemplos de dominios Fc quiméricos que pueden incluirse en cualquiera de las moléculas de unión a antígeno de la presente invención se describen en la publicación de EE. UU.
20 2014/0243504, publicada el 28 de agosto de 2014. Los dominios Fc quiméricos que tienen estas disposiciones estructurales generales y variantes de los mismos, pueden tener alterada la unión al receptor de Fc, que a su vez afecta la función efectora de Fc.

25 Variantes de secuencia

Los anticuerpos y moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la estirpe germinal correspondientes de las que se derivaron los dominios de unión a antígeno individuales. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente
30 comparando las secuencias de aminoácidos que se divulgan en el presente documento con secuencias de la estirpe germinal disponibles en, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación pueden comprender dominios de unión a antígeno que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos ilustrativas divulgadas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la estirpe germinal de la que procede el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la estirpe germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservadora del resto o restos de la estirpe germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se denominan en conjunto en el presente documento "mutaciones de la estirpe germinal"). Un experto en la materia, partiendo de las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera desveladas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión
40 a antígenos que comprendan una o más mutaciones individuales de la estirpe germinal o combinaciones de las mismas. En determinados aspectos, todos los restos de marco dentro de los dominios V_H y/o V_L se retromutan a los restos encontrados en la secuencia original de la estirpe germinal de la cual se derivó originalmente el dominio de unión a antígeno. En otros aspectos, únicamente determinados restos se retromutan a la secuencia de estirpe germinal original, por ejemplo, solo los restos mutados que se encuentran dentro de los 8 primeros aminoácidos de FR1 o dentro de los 8 últimos aminoácidos de FR4. En otros aspectos, uno o más del resto(s) del marco están mutados al resto o los restos correspondientes de una secuencia de estirpe germinal diferente (es decir, una secuencia de la estirpe germinal que es diferente de la secuencia de la estirpe germinal de la cual se derivaba originalmente el dominio de unión a antígeno). Adicionalmente, los dominios de unión a antígeno pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de estirpe germinal dentro de las regiones marco, por ejemplo, en donde determinados restos individuales mutan al resto correspondiente de una secuencia de la estirpe germinal particular, mientras que otros restos determinados, que difieren de los de la secuencia de la estirpe germinal original, se mantienen o mutan al resto correspondiente de una secuencia de estirpe germinal distinta. Una vez obtenidos, los dominios de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de estirpe germinal pueden analizarse fácilmente para una o más propiedades deseadas como, especificidad de unión mejorada, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. En la presente divulgación se incluyen moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno obtenidos de esta manera general.

60 Anticuerpos que comprenden variantes Fc

Según determinadas realizaciones de la presente invención se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que potencian o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la mutación o mutaciones aumentan la afinidad del dominio Fc por FcRn en un entorno ácido (por ejemplo, en un endosoma en donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Dichas

mutaciones pueden dar como resultado un aumento de la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de dichas modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una realización, la modificación comprende una modificación en 428L (por ejemplo, M428L) y una en 434S (por ejemplo, N434S); una modificación en 428L, 259I (por ejemplo, V259I), y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación en 433K (por ejemplo, H433K) y una en 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación en 252, 254, y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación en 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación en 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

Por ejemplo, la presente invención incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3, que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Se contemplan todas las posibles combinaciones de las mutaciones del dominio Fc anteriores y otras mutaciones dentro de los dominios variables de los anticuerpos divulgados en el presente documento.

20 **Características biológicas de los anticuerpos y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas**

La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a BCMA humano con alta afinidad (por ejemplo, valores de K_D subnanomolares).

Según determinados aspectos, la presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que se unen a BCMA humano (por ejemplo, a 25 °C) con una K_D inferior a aproximadamente 5 nM medida por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, mediante un formato de ensayo como el definido en el Ejemplo 4 en el presente documento. En determinados aspectos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen a BCMA con una K_D inferior a aproximadamente 20 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 8 nM, inferior a aproximadamente 7 nM, inferior a aproximadamente 6 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 4 nM, inferior a aproximadamente 3 nM, inferior a aproximadamente 2 nM, inferior a aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 800 pM, inferior a aproximadamente 700 pM, inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 400 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 200 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, inferior a aproximadamente 50 pM, o inferior a aproximadamente 25 pM medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, mediante un formato de ensayo como el definido en el Ejemplo 4 en el presente documento o un ensayo sustancialmente similar. La presente invención incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que se unen a BCMA humano con una K_D inferior a aproximadamente 25 pM, y que se unen a BCMA de mono con una K_D inferior a aproximadamente 170 pM, medida por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, mediante un formato de ensayo como el definido en el Ejemplo 4 en el presente documento o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a BCMA con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) superior a aproximadamente 10 minutos o superior a aproximadamente 125 minutos, medida por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C, por ejemplo, mediante un formato de ensayo como el definido en el Ejemplo 4 en el presente documento o un ensayo sustancialmente similar. En determinados aspectos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a BCMA dimerico con una $t_{1/2}$ superior a aproximadamente 3 minutos, superior a aproximadamente 4 minutos, superior a aproximadamente 10 minutos, superior a aproximadamente 20 minutos, superior a aproximadamente 30 minutos, superior a aproximadamente 40 minutos, superior a aproximadamente 50 minutos, superior a aproximadamente 60 minutos, superior a aproximadamente 70 minutos, superior a aproximadamente 80 minutos, superior a aproximadamente 90 minutos, superior a aproximadamente 100 minutos, superior a aproximadamente 110 minutos o superior a aproximadamente 120 minutos, medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C, por ejemplo, mediante un formato de ensayo como el definido en el Ejemplo 4 en el presente documento o un ensayo sustancialmente similar. La presente invención incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que se unen a BCMA con un $t_{1/2}$ de más de unos 10 minutos medido por resonancia de plasmón superficial a 25 °C, por ejemplo, mediante un formato de ensayo como el definido en el Ejemplo 4 en el presente documento o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a líneas celulares humanas que expresan BCMA endógeno (por ejemplo, NCI-H929, MOLP-8 u OMP-2) como se determina usando un ensayo de unión de FACS como se expone en el ejemplo 6 o un ensayo sustancialmente similar.

La presente invención también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 que presentan una o más características seleccionadas del grupo que consiste en: (a) inhibir el crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos que portan xenoinjertos de mieloma múltiple humano; (b) suprimir el crecimiento tumoral de tumores establecidos en ratones inmunodeprimidos que portan xenoinjertos de mieloma múltiple humano (véase,

por ejemplo, los Ejemplos 10-15), y (c) suprimir el crecimiento tumoral de células de melanoma singénico y carcinoma de colon modificadas para expresar BCMA humano en ratones inmunocompetentes que expresan CD3 humano.

5 La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 humano con alta afinidad. La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 humano con afinidad media o baja, dependiendo del contexto terapéutico y las propiedades de direccionamiento particulares que se deseen. En algunos casos, la baja afinidad incluye anticuerpos que se unen a CD3 con una K_D o CE_{50} (por ejemplo, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial) superior a 300 nM, superior a 500 nM o superior a 1 μ M. La presente divulgación también incluye anticuerpos y
10 fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 humano sin afinidad medible. Por ejemplo, en el contexto de una molécula de unión a antígeno biespecífica, en donde un brazo se une a CD3 y otro brazo se une a un antígeno diana (por ejemplo, BCMA), puede ser deseable que el brazo de unión a antígeno diana se una al antígeno diana con alta afinidad mientras que el brazo anti-CD3 se une a CD3 solo con afinidad moderada o baja o sin afinidad. De esta manera, puede conseguirse la orientación preferente de la molécula de unión a antígeno a células que
15 expresan el antígeno diana mientras se evita la unión de CD3 general/no dirigida y los consiguientes efectos secundarios adversos asociados con ella.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) que pueden unirse simultáneamente a CD3 humano y a BCMA humano. El brazo de unión que interactúa con las
20 células que expresan CD3 puede tener una unión débil a no detectable según se mide en un ensayo de unión *in vitro*. El grado en que una molécula de unión a antígeno biespecífica se une a células que expresan CD3 y/o BCMA se puede evaluar mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), como se ilustra en los Ejemplos 5 y 6 del presente documento.

25 La presente divulgación incluye anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y anticuerpos biespecíficos de los mismos que se unen a CD3 humano e inducen la activación de linfocitos T.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 que son capaces de agotar o reducir las células que expresan antígenos tumorales en un sujeto (véase, por ejemplo, los Ejemplos 8-
30 16, o un ensayo sustancialmente similar). Por ejemplo, según determinados aspectos, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3, en donde una sola administración, o administraciones múltiples, de 0,04 mg/kg, 0,4 mg/kg o 4 mg/kg de la molécula de unión a antígeno biespecífica a un sujeto provoca una reducción en el número de células que expresan BCMA en el sujeto (por ejemplo, se suprime o inhibe el crecimiento tumoral en el sujeto).
35

Preparación de dominios de unión a antígeno y construcción de moléculas biespecíficas

Los dominios de unión a antígeno específicos para antígenos particulares pueden prepararse mediante cualquier tecnología generadora de anticuerpos conocida en la técnica. Una vez obtenidos, dos dominios de unión a antígeno
40 diferentes, específicos para dos antígenos diferentes (por ejemplo, CD3 y BCMA), se pueden disponer de manera adecuada entre sí para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente invención utilizando métodos de rutina. (Una exposición de formatos de anticuerpos biespecíficos ilustrativos que se pueden utilizar para construir las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente invención se proporciona en otras partes en el presente documento). En determinadas realizaciones, uno o más de los componentes individuales (por ejemplo,
45 cadenas pesadas y ligeras) de las moléculas de unión a antígeno multiespecíficas de la invención se derivan de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Los métodos para fabricar tales anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una o más de las cadenas pesadas y/o ligeras de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden prepararse usando la tecnología VELOCIMMUNE™. Usando la tecnología VELOCIMMUNE™ (o cualquier otra tecnología de generación de anticuerpos humanos), se aíslan inicialmente los
50 anticuerpos quiméricos de afinidad elevada contra un antígeno particular (por ejemplo, CD3 o BCMA) que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para las características deseables, que incluyen afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas que pueden incorporarse en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas.
55

Los animales genéticamente modificados pueden usarse para hacer moléculas de unión a antígeno biespecíficas humanas. Por ejemplo, puede usarse un ratón genéticamente modificado que es incapaz de reorganizar y expresar una secuencia variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón, en donde el ratón expresa solo uno o dos dominios variables de cadena ligera humana codificados por secuencias de inmunoglobulina humana unidas
60 operativamente al gen constante κ de ratón en el locus κ de ratón endógeno. Tales ratones genéticamente modificados pueden usarse para producir moléculas de unión a antígeno biespecíficas completamente humanas que comprenden dos cadenas pesadas diferentes que se asocian con una cadena ligera idéntica que comprende un dominio variable procedente de uno de dos segmentos génicos de región variable de cadena ligera humana diferentes. (Véase, por ejemplo, el documento US 2011/0195454). Completamente humano se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno o dominio de inmunoglobulina del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un ADN derivado de una secuencia humana en toda la longitud de cada polipéptido del anticuerpo o fragmento de
65

unión a antígeno o dominio de inmunoglobulina del mismo. En algunos casos, la secuencia totalmente humana se deriva de una proteína endógena a un ser humano. En otros casos, la proteína o secuencia de proteína totalmente humana comprende una secuencia quimérica en donde cada secuencia constituyente se deriva de una secuencia humana. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, las proteínas o secuencias quiméricas generalmente están
5 diseñadas para minimizar la creación de epítomos inmunogénicos en las uniones de las secuencias constituyentes, por ejemplo, en comparación con cualquier región o dominio de inmunoglobulina humana de tipo silvestre.

Formulación terapéutica y administración

10 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una mejor transferencia, administración, tolerancia y similares. Se puede encontrar una multitud de formulaciones adecuadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos:
15 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Véase también Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

20 La dosis de la molécula de unión a antígeno administrada a un paciente puede variar según la edad y la talla del paciente, la enfermedad diana, afecciones, la vía de administración y similares. La dosis preferida normalmente se calcula de acuerdo con el peso o la superficie corporales. Cuando una molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente invención se utiliza con fines terapéuticos en un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar por vía
25 intravenosa la molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente invención normalmente a una dosis única de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, pueden ajustarse la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosis eficaces y los programas para administrar una molécula de unión a antígeno biespecífica pueden determinarse empíricamente; por ejemplo, puede controlarse el progreso del paciente mediante evaluación periódica, y ajustarse la dosis en consecuencia. Más aún, pueden realizarse aumentos de escala de las dosificaciones entre especies utilizando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

35 Se conocen diversos sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, aunque no de forma limitativa, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

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

55 Numerosos dispositivos de suministro de pluma y autoinyectores reutilizables tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Fráncfort, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de suministro de pluma desechables que tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), la FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y la KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), la PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), la EPIPEN (Dey, L.P.) y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs,

Abbott Park IL), por nombrar solo algunos.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede utilizarse una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos; véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana de la composición, siendo necesaria, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138). Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

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

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para su uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenida es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma farmacéutica en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo anteriormente mencionado esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas farmacéuticas.

Usos terapéuticos de las moléculas de unión a antígeno

En la presente invención, se proporciona una composición terapéutica que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica de la invención que se une específicamente a CD3 y BCMA para su uso en un método de tratamiento del mieloma múltiple, otra neoplasia maligna de linfocitos B que exprese BCMA, o un tumor que exprese BCMA. La composición terapéutica comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "un sujeto que lo necesita" se refiere a un ser humano o animal no humano que presenta uno o más síntomas o indicios de cáncer (por ejemplo, un sujeto que expresa un tumor o padece cualquiera de los cánceres mencionados a continuación en el presente documento) o que, de otro modo, se beneficiarían de una inhibición o reducción de la actividad de BCMA o de un agotamiento de las células BCMA+ (por ejemplo, células de mieloma múltiple).

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención (y composiciones terapéuticas que comprenden las mismas) son útiles, entre otras, para tratar cualquier enfermedad o trastorno en donde la estimulación, activación y/u orientación de una respuesta inmunitaria sería beneficiosa. En particular, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 de la presente invención pueden usarse para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado o mediado por expresión o actividad de BCMA o proliferación de células BCMA+. El mecanismo de acción mediante el cual se logran los métodos terapéuticos incluye destrucción de células que expresan BCMA en presencia de células efectoras, por ejemplo, mediante CDC, apoptosis, CCDA, fagocitosis, o por una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan BCMA que pueden inhibirse o destruirse usando las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención incluyen, por ejemplo, células de mieloma múltiple.

Las moléculas de unión a antígeno de la presente invención pueden usarse para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión de BCMA, que incluye, por ejemplo, un cáncer que incluye mieloma múltiple u otros cánceres de linfocitos B o de células plasmáticas, como la macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt y linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmocítico y linfoma de Hodgkin. De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 son útiles para tratar a un paciente afectado por mieloma múltiple. De acuerdo con otras realizaciones relacionadas de la invención, una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-BCMA x anti-CD3 de la invención se administra a un paciente afectado por mieloma múltiple. Pueden usarse métodos analíticos/diagnósticos conocidos en la técnica, como exploración tumoral, etc., para determinar si un paciente padece mieloma múltiple u otro cáncer de linaje de linfocitos B.

La presente invención también incluye las moléculas de unión a antígeno biespecíficas para tratar el cáncer residual en un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cáncer residual" significa la existencia o persistencia de una o más células cancerosas en un sujeto después de tratamiento con una terapia contra el cáncer.

5 Según determinados aspectos, la presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la invención para su uso en un método de tratamiento del mieloma múltiple que comprende administrar una o más de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas al sujeto después de que se haya determinado que el sujeto tiene mieloma múltiple. Por ejemplo, la presente invención incluye una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-BCMA
10 x anti-CD3 de la invención para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple, en donde la molécula de unión a antígeno se administra 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 1 año o más después de que el sujeto haya recibido otra inmunoterapia o quimioterapia.

15 **Terapias y formulaciones de combinación**

Una composición farmacéutica de la invención puede administrarse a un paciente junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales ilustrativos que pueden combinarse o administrarse en combinación con una molécula de unión a antígeno de la presente invención incluyen, por ejemplo, un agente
20 antitumoral (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, incluyendo melfalán, vincristina (Oncovin), ciclofosfamida (Cytosan), etopósido (VP-16), doxorubicina (Adriamicina), doxorubicina liposomal (Doxil), obendamustina (Treanda), o cualquier otro que se sepa que es eficaz en el tratamiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto). En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende esteroides. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico comprende terapias dirigidas que incluyen talidomida, lenalidomida y bortezomib, que son terapias
25 aprobadas para tratar a pacientes recién diagnosticados. La lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, panobinostat, ixazomib, elotuzumab y daratumumab, son ejemplos de un segundo agente terapéutico eficaz para tratar el mieloma recurrente. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un régimen que comprende radioterapia o un trasplante de células madre. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un agente inmunomodulador. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor del proteosoma, incluyendo bortezomib (Velcade), carfilzomib (Kyprolis), ixazomib (Ninlaro). En determinadas
30 realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un inhibidor de histona desacetilasa tal como panobinostat (Farydak). En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico puede ser un anticuerpo monoclonal, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor de punto de control, o combinaciones de los mismos. Otros agentes que pueden administrarse de manera beneficiosa junto con las moléculas de unión a antígeno de la invención incluyen inhibidores de citocina, incluyendo inhibidores de citocina de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 o a sus receptores respectivos. Las composiciones farmacéuticas de la presente
35 invención (por ejemplo, composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-BCMA x anti-CD3) también pueden administrarse como parte de un régimen terapéutico que comprende una o más combinaciones terapéuticas seleccionadas de un anticuerpo monoclonal distinto de los descritos en el presente documento, que puede interactuar con un antígeno diferente en la superficie de las células plasmáticas, un anticuerpo biespecífico, que tiene un brazo que se une a un antígeno en la superficie de la célula tumoral y el otro brazo se une a un antígeno en un linfocito T, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor del punto de control, por ejemplo, uno que se dirige a, PD-1 o CTLA-4, o
40 combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-1, tales como pembrolizumab (Keytruda), nivolumab (Opdivo) o cemiplimab (REGN2810). En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de PD-L1, tales como atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio) o Durvalumab (Imfinzi)). En determinadas realizaciones, los inhibidores del punto de control pueden seleccionarse de inhibidores de CTLA-4, tales como ipilimumab (Yervoy). Anteriormente se han descrito otras combinaciones que pueden utilizarse junto con un anticuerpo de la invención.

La presente invención también incluye combinaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno de la invención y un inhibidor de uno o más de VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, Tmprss2, MSLN, CA9, uroplaquina o cualquiera de las citocinas mencionadas anteriormente, en donde el inhibidor es un aptámero, una molécula antisentido, una ribozima, un ARNip, un peptidocuerpo, un nanocuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab; fragmento F(ab')₂; fragmento Fd; fragmento Fv; scFv; fragmento dAb; u otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimas). Las moléculas de unión a antígeno de la invención también pueden administrarse y/o formularse de manera conjunta en combinación con antiviricos, antibióticos, analgésicos, corticosteroides y/o AINE. Las moléculas de unión a antígeno de la invención también pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento que también incluye tratamiento con radiación y/o quimioterapia convencional.

65 El/los componente/s terapéuticamente activo/s adicional/es puede/n administrarse justo antes, de manera simultánea o poco después de la administración de una molécula de unión a antígeno de la presente invención; (para los fines de

la presente divulgación, dichas pautas de administración se consideran la administración de una molécula de unión a antígeno "junto con" un componente terapéuticamente activo adicional).

- 5 La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en donde una molécula de unión a antígeno de la presente divulgación se formula de manera conjunta con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte del presente documento.

Pautas de administración

- 10 De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, pueden administrarse a un sujeto dosis múltiples de una molécula de unión a antígeno (una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une específicamente a BCMA y CD3, tal como se define en las reivindicaciones) a lo largo de un periodo de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar de manera secuencial a un sujeto múltiples dosis de una molécula de unión a antígeno de la invención. Tal como se usa en el presente documento, "administrar de manera secuencial" significa que cada dosis de una molécula de unión a antígeno se administra al sujeto en un momento diferente, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar de manera secuencial al paciente una dosis inicial única de una molécula de unión a antígeno, seguido de una o más dosis secundarias de la molécula de unión a antígeno, y opcionalmente seguido de una o más dosis terciarias de la molécula de unión a antígeno.

- 15 Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias", y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia temporal de administración de la molécula de unión a antígeno de la invención. Por tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al inicio de la pauta terapéutica (también denominada "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundaria y terciaria pueden contener la misma cantidad de la molécula de unión a antígeno, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. En determinadas realizaciones, sin embargo, la cantidad de una molécula de unión a antígeno contenida en las dosis inicial, secundaria y/o terciaria varían entre sí (por ejemplo, ajustadas hacia arriba o hacia abajo según corresponda) durante el curso del tratamiento. En determinadas realizaciones, se administran dos o más (p. ej., 2, 3, 4 o 5) dosis al comienzo de la pauta terapéutica como "dosis de carga" seguidas de dosis posteriores que se administran con menos frecuencia (p. ej., "dosis de mantenimiento").

- 20 En una realización ilustrativa de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La expresión "la dosis inmediatamente anterior", tal como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de la molécula de unión a antígeno que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

- 25 Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender la administración a un paciente de cualquier número de dosis secundarias y/o terciarias de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti-BCMA o una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une específicamente a BCMA y a CD3). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, al paciente se le administra únicamente una sola dosis secundaria. En otras realizaciones, al paciente se le administran dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. Análogamente, en determinadas realizaciones, al paciente se le administra únicamente una sola dosis terciaria. En otras realizaciones, al paciente se le administran dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias.

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

35 **Usos de diagnóstico de los anticuerpos**

- Los anticuerpos anti-BCMA de la presente divulgación también pueden utilizarse para detectar y/o medir el BCMA, o células que expresan al BCMA, en una muestra, por ejemplo, con fines diagnósticos. Por ejemplo, un anticuerpo anti-BCMA, o un fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, subexpresión, ausencia de expresión, etc.) del BCMA. Los ensayos diagnósticos ilustrativos para el BCMA pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de

un paciente, con un anticuerpo anti-BCMA de la divulgación, en donde el anticuerpo anti-BCMA está marcado con un marcador detectable o molécula indicadora. Como alternativa, un anticuerpo anti-BCMA sin marcar puede utilizarse en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está marcado de manera detectable. El marcador detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tales como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, betagalactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Otro uso diagnóstico de ejemplo de los anticuerpos anti-BCMA de la invención incluye el anticuerpo marcado con ^{89}Zr , tal como el marcado con ^{89}Zr -desferrioxamina, con el fin de identificar y rastrear de forma no invasiva las células tumorales en un sujeto (por ejemplo, imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET, *Positron Emission Tomography*)). (Véanse, por ejemplo, Tavare, R. *et al.* Cancer Res. 1 de enero de 2016; 76(1):73-82; y Azad, BB. *et al.* Oncotarget. 15 de marzo de 2016; 7(11):12344-58). Los ensayos específicos ilustrativos que pueden utilizarse para detectar o medir al BCMA en una muestra incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

Las muestras que pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico de BCMA incluyen cualquier tejido o muestra de fluido que se puede obtener de un paciente que contiene cantidades detectables de proteína BCMA o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, se medirán los niveles de BCMA en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no afectado por una enfermedad o afección asociada a niveles o actividad de BCMA anómalos) para establecer inicialmente un nivel inicial, o estándar, de BCMA. Este nivel inicial de BCMA se puede comparar entonces con los niveles de BCMA medidos en muestras obtenidas de individuos de los que se sospecha que tienen una enfermedad o afección relacionada con BCMA (por ejemplo, un tumor que contiene células que expresan BCMA).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran pero no limitan el alcance de las reivindicaciones. Pueden incluir detalles sobre construcciones que no entran en el ámbito de las reivindicaciones; estos datos se facilitan a título meramente informativo. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-BCMA

Los anticuerpos anti-BCMA se obtuvieron inmunizando un ratón modificado genéticamente con un antígeno de BCMA humano (por ejemplo, hBCMA, SEQ ID NO: 115), o inmunizando a un ratón diseñado que comprende ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana con un antígeno de BCMA humano.

Después de la inmunización, se extrajeron esplenocitos de cada ratón y (1) se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar células de hibridoma, y se analizaron para determinar la especificidad de BCMA, o (2) se clasificaron linfocitos B (como se describe en el documento US 2007/0280945A1) usando un fragmento de BCMA humano como reactivo de clasificación que se une e identifica anticuerpos reactivos (linfocitos B positivos a antígeno).

Inicialmente se aislaron anticuerpos quiméricos contra BCMA que tenían una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizaron y seleccionaron en cuanto a características deseables, que incluyen afinidad, selectividad, etc. Si fue necesario, las regiones constantes de ratón se reemplazaron por una región constante humana deseada, por ejemplo, una región constante de IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificada, para generar un anticuerpo anti-BCMA completamente humano. Si bien la región constante seleccionada puede variar según el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de diana residen en la región variable.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-BCMA: La Tabla 1 expone los identificadores de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y las CDR de los anticuerpos anti-BCMA seleccionados de la invención. Los identificadores de secuencias de ácido nucleico correspondientes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de secuencias de aminoácidos

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80
mAb21587	122				123			
mAb21589	124				125			

Tabla 2: Identificadores de secuencias de ácido nucleico

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

5 Ejemplo 2: Generación de anticuerpos anti-CD3

Los anticuerpos anti-CD3 se generaron como se describe en el documento WO 2017/053856. Se seleccionaron dos de estos anticuerpos anti-CD3 de la producción de anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 de acuerdo con la presente invención. La Tabla 3 muestra los identificadores de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de los anticuerpos anti-CD3 seleccionados. Los identificadores de secuencias de ácido nucleico correspondientes se exponen en la Tabla 4. Otros anticuerpos anti-CD3 para su uso en la preparación de anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente invención se pueden encontrar en, por ejemplo, el documento WO 2014/047231.

15

Tabla 3: Identificadores de secuencias de aminoácidos

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb7221G	90	92	94	96	82	84	86	88
mAb7221G20	98	100	102	104	82	84	86	88

Tabla 4: Identificadores de secuencias de ácido nucleico

Denominación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb7221G	89	91	93	95	81	83	85	87
mAb7221G20	97	99	101	103	81	83	85	87

Ejemplo 3: Generación de anticuerpos biespecíficos que se unen a BCMA y CD3

20

La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a CD3 y BCMA; dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas también se denominan en el presente documento "moléculas biespecíficas anti-BCMA x anti-CD3 o anti-CD3xBCMA o anti-BCMA x anti-CD3". La parte anti-BCMA de la molécula biespecífica anti-BCMA/anti-CD3 es útil para dirigirse a las células tumorales que expresan BCMA (también conocida

como CD269), y la parte anti-CD3 de la molécula biespecífica es útil para activar los linfocitos T. La unión simultánea de BCMA en una célula tumoral y CD3 en un linfocito T facilita la destrucción dirigida (lisis celular) de la célula tumoral diana por parte del linfocito T activado.

- 5 Se construyeron anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio de unión específico anti-BCMA y un dominio de unión específico anti-CD3 mediante metodologías convencionales, en donde el dominio de unión a antígeno anti-BCMA y el dominio de unión a antígeno anti-CD3 comprenden cada uno diferentes, distintas HCVR emparejadas con una LCVR común. En los anticuerpos biespecíficos ilustrados, las moléculas se construyeron mediante una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3, una cadena pesada de un anticuerpo anti-BCMA y una cadena ligera común del anticuerpo anti-CD3 (10082). En otros casos, los anticuerpos biespecíficos pueden construirse mediante una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD3, una cadena pesada de un anticuerpo anti-BCMA y una cadena ligera de anticuerpo conocida por ser promiscua o emparejarse eficazmente con una variedad de brazos de cadena pesada.

Tabla 5: Resumen de los componentes de los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3

Identificador de anticuerpo biespecífico	Anti-BCMA	Anti-CD3	Región variable de cadena ligera común
	Dominio de unión a antígeno <i>Región variable de cadena pesada</i>	Dominio de unión a antígeno <i>Región variable de cadena pesada</i>	
bsAb25441D9 (también denominado REGN5458)	mAb21581	mAb7221G	mAb7221G
bsAb25442D (también denominado REGN5459)	mAb21581	mAb7221G20	mAb7221G20

- 15 La Tabla 6 muestra los identificadores de secuencia de aminoácidos para los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 aquí ejemplificados.

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3

Identificador de anticuerpo biespecífico	Primer dominio de unión a antígeno anti-BCMA				Segundo dominio de unión a antígeno anti-CD3				Región variable de cadena ligera común			
	HC VR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	HC VR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LC VR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
bsAb25441D (REGN5458)	66	68	70	72	90	92	94	96	82	84	86	88
bsAb25442D (REGN5459)	66	68	70	72	98	100	102	104	82	84	86	88

- 20 **Ejemplo 4: Afinidades de unión y constantes cinéticas derivadas de la resonancia de plasmón superficial de anticuerpos anti-BCMA y anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3**

- 25 Las constantes de disociación de equilibrio (valores K_D) para la unión de hBCMA.mmh (SEQ ID NO: 106) a mAbs anti-BCMA purificados y mAbs biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 se determinaron mediante un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real utilizando un instrumento Biacore 4000. La superficie del sensor CM5 Biacore se derivatizó mediante acoplamiento amínico con un anticuerpo Fc monoclonal antihumano de ratón (GE, n.º BR-1008-39) para capturar mAbs anti-BCMA purificados y mAbs biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3. Todos los estudios de unión Biacore se realizaron en un tampón compuesto por HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 0,05 % v/v (tampón de ejecución HBS-ET). Para afinidades monoméricas, diferentes concentraciones del dominio extracelular de BCMA humano expresado con marcador myc-myc-hexahistidina C-terminal (BCMA-MMH humano; SEQ ID NO: 106) o BCMA de mono expresado con marcador myc-myc-hexahistidina C-terminal (BCMA-MMH de mono; SEQ ID NO: 110) se prepararon en tampón de ejecución HBS-ET (diluciones triples que varían de 90 a 1,11 nM). Para afinidades dimericas, se prepararon diferentes concentraciones del dominio extracelular de BCMA humano expresado con marcador mFc C-terminal (BCMA-MFC humano; SEQ ID NO: 108) BCMA de mono expresado con marcador mFc C-terminal (BCMA-MFC de mono; SEQ ID NO: 112) preparado en tampón de ejecución HBS-ET (diluciones triples que varían de 30 a 0,37 nM) o BCMA 30 nM expresado con marcador mFc C-terminal (BCMA-MFC de ratón; SEQ ID NO: 114). A continuación, se inyectaron muestras de antígeno sobre las superficies capturadas con mAbs biespecíficos anti-BCMA y anti-BCMA x anti-CD3 a un caudal de 30 ul/minuto. Se monitorizó la asociación anticuerpo-reactivo durante 5 minutos mientras que se monitorizó la disociación en tampón de ejecución HBS-ET durante 10 minutos. Todos los experimentos de cinética de unión se realizaron a 25 °C. Las constantes cinéticas de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) se determinaron ajustando los sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 mediante el *software* de ajuste de curvas Scrubber 2.0c. Las constantes de disociación en equilibrio (K_D) de unión y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes cinéticas como:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ y } t_{1/2} (\text{min}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Como se muestra en la Tabla 7, a 25 °C, todos los anticuerpos anti-BCMA de la invención se unieron a BCMA-MMH humano con valores de K_D que variaban de 1,06 nM a 3,56 nM. Como se muestra en la Tabla 8, a 25 °C, todos los anticuerpos anti-BCMA de la invención se unieron a BCMA-MFC humano con valores de K_D que variaban de 22,3 pM a 103 pM. Como se muestra en la Tabla 9, a 25 °C, dos de los anticuerpos anti-BCMA de la invención se unieron a BCMA-MMH de mono con valores de K_D que variaban de 38,8 nM a 49,92 nM. Como se muestra en la Tabla 10, a 25 °C, cuatro de los anticuerpos anti-BCMA de la invención se unieron a BCMA-MFC de mono con valores de K_D que variaban de 148 pM a 14,7 nM. Como se muestra en la Tabla 11, a 25 °C, cuatro de los anticuerpos anti-BCMA de la invención se unieron a BCMA-MFC de ratón con valores de K_D que variaban de 677 pM a 18,8 nM.

Tabla 7: Parámetros de la cinética de unión de anticuerpos monoclonales anti-BCMA que se unen a BCMA-MMH humano a 25 °C

REGN n.º	Ab PID n.º	Captura de mAb (UR)	Unión de hBCMA.mmh 90nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	437,5 ± 1,1	19,9	8,27E+05	8,74E-04	1,06E-09	13,2
REGN5459	bsAb25442D	384,8 ± 1,4	17,0	7,30E+05	1,01E-03	1,38E-09	11,5
	mAb16711	275,0 ± 2,8	22,2	2,01E+06	3,47E-03	1,73E-09	3,3
	mAb16716	310,3 ± 2,2	26,4	8,41E+05	2,99E-03	3,56E-09	3,9
REGN4514	mAb16732	284,1 ± 0,9	25,3	1,06E+06	2,85E-03	2,69E-09	4,1
REGN4515	mAb16747	332,5 ± 0,9	31,4	8,69E+05	2,47E-03	2,84E-09	4,7

Tabla 8: Parámetros de la cinética de unión de anticuerpos monoclonales anti-BCMA que se unen a BCMA-MFC humano a 25 °C

REGN n.º	Ab PID n.º	Captura de mAb (UR)	Unión de hBCMA.mFc 30nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	437,9 ± 0,1	106,8	4,48E+05	≤ 1E-5	2,23E-11	≤1155
REGN5459	bsAb25442D	385,2 ± 0,1	96,8	4,49E+05	≤ 1E-5	2,23E-11	≤1155
	mAb16711	268,9 ± 1,4	113,5	1,85E+06	1,90E-04	1,03E-10	60,8
	mAb16716	303,4 ± 1,2	120,3	8,62E+05	8,35E-05	9,68E-11	138,4
REGN4514	mAb16732	282,3 ± 1,0	124,1	1,07E+06	4,53E-05	4,22E-11	255,2
REGN4515	mAb16747	327,3 ± 1,5	146,0	1,41E+06	8,95E-05	6,33E-11	129,0

Tabla 9: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-BCMA que se unen a BCMA-MMH de mono a 25 °C

REGN n.º	Ab PID n.º	Captura de mAb (UR)	Unión de mfBCMA.mmh 90 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	438,2 ± 0,9	14,8	1,82E+05	9,09E-03	4,99E-08	1,3
REGN5459	bsAb25442D	384,6 ± 1,4	12,7	2,23E+05	8,64E-03	3,88E-08	1,3
	mAb16711	263,5 ± 1,7	-0,5	NB	NB	NB	NB
	mAb16716	301,8 ± 0,5	0,8	NB	NB	NB	NB
REGN4514	mAb16732	279,1 ± 0,8	1,1	NB	NB	NB	NB
REGN4515	mAb16747	326,2 ± 0,5	1,9	NB	NB	NB	NB

Tabla 10: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-BCMA que se unen a BCMA-MFC de mono a 25 °C

REGN n.º	Ab PID n.º	Captura de mAb (UR)	Unión de mBCMA.mFc 30 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	437,9 ± 1,1	107,7	5,28E+05	8,80E-05	1,67E-10	131,2
REGN5459	bsAb25442D	386,2 ± 0,22	97,0	4,82E+05	7,15E-05	1,48E-10	161,6
	mAb16711	259,4 ± 1,4	0,9	NB	NB	NB	NB
	mAb16716	300,8 ± 0,6	3,2	IC	IC	IC	IC
REGN4514	mAb16732	276,9 ± 1,1	40,3	4,92E+05	7,24E-03	1,47E-08	1,6
REGN4515	mAb16747	324,4 ± 0,7	101,3	2,13E+06	7,16E-03	3,37E-09	1,6

Tabla 11: Parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-BCMA a BCMA-MFC de ratón a 25 °C

REGN n.º	Ab PID n.º	Captura de mAb (UR)	Unión de mBCMA.mFc 30 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (min)
REGN5458	bsAb25441D	438,8	2,7	NB	NB	NB	NB
REGN5459	bsAb25442D	383,9	2,4	NB	NB	NB	NB
	mAb16711	257,0	90,0	1,07E+06	1,10E-03	1,02E-09	10,5
	mAb16716	300,0	33,4	2,05E+05	3,85E-03	1,88E-08	3,0
REGN4514	mAb16732	276,1	109,6	3,97E+05	2,69E-04	6,77E-10	43,0
REGN4515	mAb16747	323,1	107,6	9,47E+05	4,18E-03	4,42E-09	2,8

5 Ejemplo 5: Unión de FACS de anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 a células humanas y de macaco cangrejero que expresan CD3

Se utilizó el análisis de citometría de flujo para determinar la unión de los anticuerpos biespecíficos BCMAxCD3 a células CD3 humanas y de macaco cangrejero (células Jurkat, células Jurkat modificadas con mFC3, linfocitos T CD8+ humanos primarios y linfocitos T CD8+ de macaco cangrejero). Brevemente, se incubaron 1e05 células/pocillo en presencia de lavado de FACS con bloque (PBS+FBS filtrado al 1 % + suero de ratón al 5 %) con una dilución en serie de BCMAxCD3 y anticuerpos de control durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con lavado de FACS frío (PBS + FBS filtrado al 1 %) y el anticuerpo unido se detectó incubando con anticuerpo secundario antihumano conjugado con Alexa647 en hielo durante 30 minutos más. Se utilizaron como control pocillos que no contenían anticuerpos o que solo contenían anticuerpos secundarios. Para la detección de linfocitos T humanos y de mono, un cóctel de anticuerpos humanos y de macaco cangrejero de reactividad cruzada frente a CD4, CD8 y CD16 se añadió al secundario antihumano. Después de la incubación, las células se lavaron, se volvieron a suspender en 200 µl de PBS frío que contenía FBS filtrado al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo en un BD FACS Canto II. Las células fueron seleccionadas por FSC-H por FSC-A para seleccionar eventos singlete, seguido de dispersiones laterales y hacia delante para seleccionar los eventos vivos. Para linfocitos T de mono, se realizó una selección adicional en células CD8+/CD16-.

Los valores de CE50 para la unión de FACS se calcularon mediante análisis de regresión no lineal de 4 parámetros en el *software* Prism.

Las células Jurkat son una línea celular linfoblástica de linfocitos T que expresan CD3 humano. REGN5458 se unió a CD3 humano en células Jurkat y los linfocitos T CD8+ humanos primarios con CE50 medianas de $1,50 \times 10^{-8}$ M y $3,20 \times 10^{-8}$ M respectivamente. La unión de REGN5459 a CD3 humano fue más débil, con una CE50 mediana de $5,58 \times 10^{-7}$ M en células Jurkat y de $4,71 \times 10^{-6}$ en linfocitos T CD8+ humanos primarios. Utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, se modificó una línea celular Jurkat para que expresara las cadenas CD3ε y CD3δ de macaco cangrejero en lugar de las versiones humanas. La CE50 mediana de unión del REGN5458 a la línea celular Jurkat modificada con mFC3 fue de $1,51 \times 10^{-8}$ M y a los linfocitos T CD8+ de macaco cangrejero primarios fue de $4,66 \times 10^{-8}$ M. REGN5459 no se unió a las células que expresaban mFC3.

No se observó unión en ninguna línea celular para el anticuerpo de control de isotipo negativo, denominado mAb15260.

Tabla 12: Unión a células que expresan CD3: CE50 mediana

REGN	Jurkat-hCD3		Jurkat-mfCD3		Linfocitos T CD8+ humanos		Linfocitos T CD8+ Mf (macaco)	
	CE50 [M]	n	CE50 [M]	n	CE50 [M]	n	CE50 [M]	n
REGN5458	1,50E-08	5	1,51E-08	2	3,20E-08	1	4,66E-08	1
REGN5459	5,58E-07	5	Sin unión	2	4,71E-06	1	Sin Unión	1

Ejemplo 6: Ensayo de unión de FACS para evaluar la capacidad de unión a antígeno de la superficie celular

Se determinó la capacidad del anticuerpo anti-BCMA x CD3, mAb25442D, para unirse a la superficie de las células de mieloma múltiple BCMA positivo (NCI-H929, MM.1S, OPM-2 y RPMI-8226), de linfoma BCMA positivo (Raji y Daudi) y BCMA negativo (HEK293) mediante citometría de flujo. Las células se recogieron de los matraces utilizando tampón de disociación celular (Millipore, n.º de cat. S-004-C) y se colocaron en tampón de tinción (PBS, sin calcio ni magnesio (Irving 9240) + FBS al 2 % (ATCC 30-2020) a una densidad de 500.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en V. Las células se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con diluciones seriadas dobles de un anticuerpo anti-BCMA x CD3 conjugado con Alexa647 (mAb25442D-A647) o un control de isotipo conjugado con Alexa 647 con el mismo brazo de unión a CD3 emparejado con un brazo de direccionamiento tumoral irrelevante (Isotipo-A647). Las células se lavaron dos veces con tampón de tinción y se marcaron con el kit LIVE/DEAD™ Fixable Green Dead Cell Stain (Invitrogen, L34970) siguiendo las instrucciones del fabricante para discriminar entre células vivas y muertas. A continuación, se lavaron las células y se fijaron durante 25 minutos a 4 °C con una solución al 50 % de BD Cytotfix (BD, n.º de cat. 554655) diluida en PBS. Las muestras se procesaron en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences) y se analizaron en Flowjo 10.2 (Tree Star). Después de la selección de células vivas y células individuales, se determinó la intensidad fluorescente media (MFI, *mean fluorescent intensity*), y los valores de MFI se trazaron en Graphpad Prism utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos para calcular las CE₅₀. En el análisis también se incluye la condición cero de cada curva de respuesta a la dosis como una continuación de la dilución en serie doble y se representa como la dosis más baja. La relación señal/ruido (S/N, *signal to noise*) se determina tomando la relación entre la MFI del mAb25442D-A647 y la MFI del isotipo-A647. (Tabla 13). La relación S/N de mAb25442D-A647 varió de 2 a 470 y los valores de CE₅₀ de 27 a 83 nM. No se observó ninguna unión detectable en células HEK293.

25

Tabla 13: Unión a las células

Estirpe celular	S/N mAb25442D-A647	CE ₅₀ mAb25442D-A647 (nM)
NCI-H929	470	79
MM.1S	43	83
OPM-2	19	57
RPMI-8226	9	27
Daudi	3	ND
Raji	2	ND
HEK293	1	ND

ND = no determinado debido a curvas no sigmoidales

Ejemplo 7: Activación de linfocitos T mediante anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 en presencia de células que expresan BCMA

La actividad de los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 se evaluó en un bioensayo indicador Jurkat/NFATLuc utilizando varias líneas celulares con distintos niveles de expresión superficial de BCMA. Las células Jurkat se modificaron para que expresaran un indicador NFAT-luciferasa (Jurkat/NFATLuc.3C7), y se combinaron 50.000 células Jurkat indicadoras con 50.000 BCMA positivo (Daudi, MM1-S, NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226, MOLT-8, o Raji) o BCMA negativo (HEK293) en placas de micropocillos blancas Thermo Nunclon delta de 96 pocillos (Thermo Scientific, Cat # 136102) en 50 ul de medio de ensayo (medio RPMI con FBS al 10 % y P/S/G al 1 %). Se añadieron inmediatamente diluciones seriadas triplicadas de los anticuerpos biespecíficos BCMA x CD3 (mAb25441D o mAb25442D), o un anticuerpo bivalente anti-BCMA (mAb21581) en 50 ul de tampón de ensayo. Las placas se agitaron suavemente y se incubaron a 37 °C, en la incubadora con 5 % de CO₂ durante 4-6 horas. La actividad NFAT-luciferasa se midió utilizando Promega One-Glo (n.º de cat. E6130) y un lector de placas Perkin Elmer Envision. Las RLU se trazaron en GraphPad Prism utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 12 puntos para calcular los valores de CE₅₀. En el análisis también se incluye la condición de tratamiento sin anticuerpos de cada curva de respuesta a la dosis como una continuación de la dilución en serie triple y se representa como la dosis más baja. La relación señal/ruido (S:N) se determina tomando la relación entre la RLU más alta de la

curva y la más baja.

mAb25441D activó las células Jurkat/NFATLuc en presencia de células que expresaban BCMA con CE50 que variaban de 0,61 nM a 2,1 nM y S:N de 8 a 123. mAb25442D activó las células Jurkat/NFATLuc en presencia de células que expresaban BCMA con CE50 que variaban de 2,6 nM a 11 nM y S:N que variaban de 7 a 120. El mAb25441D biespecífico de BCMA x CD3 con el brazo de unión a CD3 de mayor afinidad fue sistemáticamente más potente que mAb25442D con un brazo de unión a CD3 de menor afinidad; mientras que, la relación S:N fue similar para los dos biespecíficos. Ninguno de los anticuerpos activó las células Jurkat/NFATLuc en presencia de células HEK293, y los anticuerpos biespecíficos de control no aumentaron significativamente la actividad indicadora de Jurkat con ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba. Los resultados se muestran en las Tablas 14A y 14B, a continuación.

Tabla 14A: Activación de linfocitos T

Anticuerpos	Daudi		MM1-S		NCI-H929		OPM-2	
	CE50	S:N	CE50	S:N	CE50	S:N	CE50	S:N
bsAb25441D	2,1E-9	43	1,2E-9	165	6,8E-10	39	6,6E-10	8
bsAb25442D	7,9E-9	25	4,4E-9	120	2,7E-9	32	2,6E-9	7
mAb21581	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1

Tabla 14B: Activación de linfocitos T

Anticuerpos	RPMI-8226		MOLP-8		Raji		HEK293	
	CE50	S:N	CE50	S:N	CE50	S:N	CE50	S:N
bsAb25441D	6,1E-10	55	1,4E-9	32	1,6E-9	123	ND	1
bsAb25442D	2,6E-9	42	1,1E-8	31	7,4E-9	78	ND	1
mAb21581	ND	1	ND	1	ND	1	ND	1

Ejemplo 8: Ensayo de citotoxicidad basado en FACS para evaluar la destrucción mediada por linfocitos T de células de mieloma múltiple que expresan BCMA en presencia de anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3

La capacidad de unión a anticuerpos (ABC) de un anticuerpo BCMA antihumano disponible en el mercado (clon 19F2) se determinó en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple utilizando un kit Quantum Simply Cellular anti-IgG humana y siguiendo las instrucciones del fabricante (Bangs Laboratories).

Brevemente, líneas celulares de mieloma múltiple (MM) (H929, MM1S, U266, MOLP8 y RPMI8226) y perlas Quantum Simply Cellular se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con una titulación de anticuerpo anti-hBCMA-19F2 conjugado con APC. Después de la incubación, las células y las perlas se lavaron tres veces, se volvieron a suspender en 200 µl de PBS frío que contenía FBS filtrado al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo. Utilizando el molde QuickCal® (Bangs Labs), la ABC de un nivel saturante de anti-BCMA 19F2 para cada línea celular se interpoló a partir de la curva estándar generada por la intensidad del canal de las poblaciones de microesferas en saturación.

La destrucción de células diana que expresaban BCMA por linfocitos T humanos o de mono macaco cangrejero en reposo se determinó mediante citometría de flujo. Brevemente, se colocaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humanas o de mono macaco cangrejero en medio RPMI (humano) o X-Vivo (macaco) suplementado a 1×10^6 células/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para enriquecerlas en linfocitos mediante el agotamiento de los macrófagos adherentes, células dendríticas y algunos monocitos. Al día siguiente, las células diana que expresaban BCMA se marcaron con 1µM de Violet CellTrace y se incubaron conjuntamente con PBMC sin células adherentes (relación células efectoras/diana 4:1) y una dilución en serie de biespecíficos BCMAxCD3, o anticuerpos de control a 37 °C. Después de 48-72 h, se retiraron las células de las placas de cultivo celular, se tiñeron con un cóctel de anticuerpos de fenotipado y colorante de viabilidad de células vivas/muertas, y se analizaron por FACS. Para cuantificar el número de células diana vivas presentes en los pocillos, se añadieron 20 µl de perlas de recuento absoluto CountBright a los pocillos justo antes de la adquisición. Para la evaluación de la especificidad de destrucción, las células se seleccionaron en poblaciones marcadas con Violet CellTracker. El porcentaje de supervivencia de las células diana se calculó del siguiente modo: Supervivencia de células diana = $(R_1/R_2) \times 100$, donde R_1 = número absoluto de células diana vivas en presencia de células efectoras y anticuerpo, y R_2 = número de células diana vivas únicamente (cultivadas sin células efectoras ni anticuerpo de prueba).

Los linfocitos T CD8+ humanos se clasificaron como CD45+/CD14-/CD4-/CD8+. Los linfocitos T CD8+ de macaco cangrejero se seleccionaron como CD45+/CD20-/CD14-/CD4-/CD8+ La activación de linfocitos T se calculó como el

porcentaje de linfocitos T CD25+ o CD69+ del total de linfocitos T CD8+.

Los valores de CE50 para la supervivencia de las células diana y la activación de los linfocitos T se calcularon mediante un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros en el software Prism.

5 Se probó la capacidad de los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 de activar linfocitos T humanos y de macaco cangrejero en reposo para destruir un panel de células que expresan BCMA con diferentes niveles de BCMA en superficie. Con linfocitos T humanos en reposo como células efectoras, REGN5458 provocó la destrucción de 5 líneas celulares de BCMA diferentes con valores de CE₅₀ que variaban de 7,07×10⁻¹⁰ M a 3,45×10⁻¹¹ M. REGN5459
10 mostró la destrucción de las mismas 5 líneas celulares con valores de CE50 que variaban de 1,66×10⁻⁹ M a 1,06×10⁻¹⁰ M. Las CE₅₀ para la activación de linfocitos T, según se midió por la regulación por aumento de CD25 en los linfocitos T CD8+ fueron similares a las CE₅₀ de destrucción. Se observó una modesta activación de linfocitos T en presencia de mAb17664D de control de isotipo CD3 de 1 brazo, pero sólo para la línea celular U266. No se observó citotoxicidad en los controles de isotipo sometidos a prueba.

15 La destrucción mediada por BCMAxCD3 por linfocitos T de macaco cangrejero se probó solo en la línea celular H929 de MM. La CE₅₀ para la citotoxicidad mediada por REGN5458 y REGN5459 fue de 2,34×10⁻¹¹ y 6,92×10⁻¹¹ respectivamente. No se observó citotoxicidad ni activación de linfocitos T para el anticuerpo mAb15260 de control del isotipo con células efectoras humanas o de macaco cangrejero. Los resultados se muestran en las Tablas 15A, 15B y
20 16, a continuación.

Tabla 15A: CE₅₀ mediana, Células efectoras humanas

n.º REGN	H929 (40000 ABC)			MM1S (18000 ABC)			U266 (13000 ABC)		
	n	% de supervivencia	% de activación T	n	% de supervivencia	% de activación T	n	% de supervivencia	% de activación T
REGN5458	3	1,03E-10	2,11E-10	2	6,46E-11	7,06E-11	1	3,28E-10	1,07E-10
REGN5459	4	3,01E-10	3,00E-10	2	2,88E-10	4,58E-10	1	1,66E-09	4,69E-10

Tabla 15B: CE₅₀ mediana, Células efectoras humanas

n.º REGN	RPMI8226 (10000 ABC)			Molp8 (2000 ABC)		
	n	% de supervivencia	% de activación T	n	% de supervivencia	% de activación T
REGN5458	1	3,45E-11	6,49E-11	2	7,07E-10	1,10E-9
REGN5459	1	1,06E-10	7,50E-10	3	1,36E-09	6,47E-9

Tabla 16: CE₅₀ mediana, Células efectoras de macaco cangrejero

n.º REGN	H929		
	n	% de supervivencia	% de activación T
REGN5458	4	2,34E-11	6,83E-11
REGN5459	4	6,92E-11	1,58E-10

Ejemplo 9: Ensayo de citotoxicidad por FACS para la destrucción de células blásticas primarias de mieloma múltiple mediada por linfocitos T autólogos en presencia de anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3

30 Para controlar la destrucción específica de células de mieloma múltiple mediante citometría de flujo, se depositaron células mononucleares de médula ósea (BMMC, por sus siglas en inglés) procedentes de pacientes con mieloma múltiple sobre células estromales humanas (HS5) y se dejaron en reposo toda la noche a 37 °C. Por separado, se
35 descongelaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) del paciente y se cultivaron en medio RPMI suplementado a 1×10⁶ células/ml durante la noche a 37 °C para enriquecerlas con linfocitos mediante la eliminación de las células adherentes. Al día siguiente, se incubaron conjuntamente BMMC con PBMNC indiferenciadas de células adherentes sin células estromales (HS5) y una dilución 10x en serie de biespecíficos BCMAxCD3 o de control de isotipo CD3 de 1 brazo (concentración inicial 66,7 nM) a 37 °C. Se retiraron las células de las placas de cultivo en los días 3, 4 o 7 y se analizaron por FACS. Para la evaluación de la especificidad de destrucción, las células de mieloma múltiple se seleccionaron como individuales, vivas, negativas para CD90 (para excluir células estromales), negativas para CD2, positivas para CD56. El CD45 fue bajo en células de mieloma múltiple en la mayoría de las muestras, excepto en MM455. El porcentaje de células diana vivas se indicó para el cálculo de supervivencia ajustada como sigue: Supervivencia ajustada = (R1/R2)*100, donde R1 = % de células diana vivas en presencia de anticuerpo, y
40 R2 = % de células diana vivas en ausencia de anticuerpo de ensayo.

Los linfocitos T se clasificaron como positivos para CD2, negativos para CD56 y positivos para CD4 o CD8. La activación de linfocitos T se calculó como el porcentaje de linfocitos T CD4 o CD8 CD25+ sobre el total de linfocitos T CD4 o CD8.

5 Se sometió a prueba la capacidad de los anticuerpos biespecíficos BCMAxCD3 para redirigir la destrucción de células blásticas de mieloma múltiple primario por PBMC de donantes autólogos. La citotoxicidad máxima mediada por BCMAxCD3 de blastos primarios de MM varió del 52-96 %, con CE50 que variaban de $9,89 \times 10^{-11}$ M a $3,67 \times 10^{-9}$ M para REGN5458 y $4,96 \times 10^{-10}$ M a $7,94 \times 10^{-8}$ M para REGN5459. La activación de los linfocitos T se midió evaluando la regulación por aumento de CD25 en los linfocitos T CD8+. Las CE50 de activación de linfocitos T variaron de $3,23 \times 10^{-9}$ a $1,69 \times 10^{-1}$. Se observó una modesta citotoxicidad y activación de linfocitos T para el control de isotipo CD3 de 1 brazo (sin unión a diana). Los resultados se muestran en las Tablas 17A y 17B, a continuación.

Tabla 17A: % de lisis de MM

ID de la muestra	Estadio de la enfermedad	Relación E:T	duración del tratamiento	% de lisis de MM a 66 nM REGN5458	% de lisis de MM a 66 nM REGN5459	% de lisis de MM a 66 nM isotipo
MM2	recién diagnosticado	1,4	7 días	88	85	27,5
MM369	recién diagnosticado	0,3	3 días	96	94	0
MM453	recién diagnosticado	2,4	3 días	82	80	40
MM455	progresión, tratado	0,4	3 días	63	52	24

Tabla 17B: CE50 de lisis de MM y activación de linfocitos T

ID de la muestra	Estadio de la enfermedad	Relación E:T	duración del tratamiento	CE50 de lisis de MM REGN5458	CE50 de lisis de MM REGN5459	CE50 de reg. por aumento de CD25 REGN5456	CE50 de reg. por aumento de CD25 REGN5456
MM2	recién diagnosticado	1,4	7 días	7,47E-10	7,24E-09	No realizado	No realizado
MM369	recién diagnosticado	0,3	3 días	1,07E-10	4,96E-10	1,69E-10	2,03E-10
MM453	recién diagnosticado	2,4	3 días	9,89E-11	1,19E-09	1,71E-10	3,23E-9
MM455	progresión, tratado	0,4	3 días	3,67E-09	7,94E-08	2,06E-10	1,16E-9

Ejemplo 10: Anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 impiden el crecimiento de tumores que expresan BCMA (NCI-H929) *in vivo* en un modelo de tumor xenogénico

20 Para determinar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos (Abs) biespecíficos BCMAxCD3, se realizó un estudio de tumores xenogénicos. A los ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1wjl}/SzJ (NSG) se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 10×10^6 células de mieloma múltiple NCI-H929 que expresaban BCMA y $0,5 \times 10^6$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas aisladas de un donante normal. A los ratones (n=7 por grupo) se les administró inmediatamente un control con vehículo de PBS, un Ab de control de isotipo bivalente anti-FcγD1 irrelevante (REGN2759), un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (mAb17664D), un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458), o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a una dosis de 4 mg/kg. Se administró Abs a los ratones dos veces por semana durante un total de tres semanas, y se evaluó el crecimiento tumoral durante 40 días. Mientras que los tumores BCMA⁺ crecieron de forma similar en los ratones tratados con vehículo, con control de isotipo y con control de unión a CD3, los dos Abs BCMAxCD3 que se sometieron a prueba impidieron el crecimiento de tumores *in vivo*.

35 *Implantación y medición de tumores singénicos:* A los ratones NSG se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 10×10^6 células de mieloma múltiple NCI-H929 que expresaban BCMA y $0,5 \times 10^6$ PBMC derivadas de un donante normal. A los ratones (n=7 por grupo) se les administró inmediatamente un control con vehículo de PBS, un Ab de control de isotipo bivalente anti-FcγD1 irrelevante (REGN2759), un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (mAb17664D), un Ab biespecífico contra BCMAxCD3 (G; REGN5458), o un Ab biespecífico contra BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a una dosis de 4 mg/kg. A los ratones se les administró Abs dos veces por semana durante un total de tres semanas. El crecimiento tumoral se midió con calibradores dos veces por semana durante todo el experimento. Los ratones se sacrificaron 40 días después de la implantación del tumor.

Cálculo del crecimiento y de la inhibición de tumores singénicos: Con el fin de determinar el volumen tumoral con un calibrador externo, se determinó el mayor diámetro longitudinal (longitud en mm) y el mayor diámetro transversal (anchura en mm). El volumen tumoral basado en las medidas del calibrador se calculó mediante la fórmula: Volumen (mm^3) = (longitud x anchura²)/2.

5

Los Abs biespecíficos BCMAxCD3 impidieron el crecimiento de tumores BCMA⁺ NCI-H929 *in vivo* en un modelo tumoral xenogénico. Los resultados se muestran en la tabla 18, a continuación.

Tabla 18: Tamaño promedio del tumor en diferentes puntos temporales

Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 4
PBS (Control de vehículo)	67,1 \pm 5,9
REGN2759 (Control de isotipo)	62,6 \pm 3,7
mAb17664D (Control de unión a CD3)	76,1 \pm 7,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	39,5 \pm 9,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	26,5 \pm 6,2
Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 7
PBS (Control de vehículo)	123,0 \pm 25,2
REGN2759 (Control de isotipo)	109,7 \pm 20,3
mAb17664D (Control de unión a CD3)	182,0 \pm 19,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 \pm 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 \pm 0
Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 11
PBS (Control de vehículo)	361,5 \pm 35,7
REGN2759 (Control de isotipo)	415,3 \pm 11,4
mAb17664D (Control de unión a CD3)	449,6 \pm 46,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 \pm 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 \pm 0
Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 14
PBS (Control de vehículo)	581,4 \pm 57,9
REGN2759 (Control de isotipo)	734,3 \pm 41,8
mAb17664D (Control de unión a CD3)	741,2 \pm 56,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 \pm 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 \pm 0
Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 18
PBS (Control de vehículo)	1033,4 \pm 143,7
REGN2759 (Control de isotipo)	1586,1 \pm 101,4
mAb17664D (Control de unión a CD3)	1511,4 \pm 80,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 \pm 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 \pm 0
Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 21
PBS (Control de vehículo)	1730,9 \pm 244,8
REGN2759 (Control de isotipo)	2554,7 \pm 148,8

Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 21
mAb17664D (Control de unión a CD3)	2474,0 ± 132,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0
Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 28
PBS (Control de vehículo)	Sacrificado- No se ha medido
REGN2759 (Control de isotipo)	Sacrificado- No se ha medido
mAb17664D (Control de unión a CD3)	Sacrificado- No se ha medido
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0
Anticuerpo (4 mg/kg)	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 40
PBS (Control de vehículo)	Sacrificado- No se ha medido
REGN2759 (Control de isotipo)	Sacrificado- No se ha medido
mAb17664D (Control de unión a CD3)	Sacrificado- No se ha medido
REGN5458 (BCMAxCD3-G)	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20)	0 ± 0

Ejemplo 11: Anticuerpos biespecíficos anti-BCMA x anti-CD3 previenen el crecimiento de tumores que expresan BCMA (NCI-H929) de forma dependiente de la dosis en un modelo tumoral xenogénico *in vivo*

- 5 Para determinar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA x anti-CD3, se realizó un estudio de tumores xenogénicos. A los ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1wjl}/SzJ (NSG) se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 10×10^6 células tumorales humanas de mieloma múltiple NCI-H929 que expresaban BCMA y $0,5 \times 10^6$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas aisladas de un donante normal sano. A continuación, se administró inmediatamente a los ratones (n=7 por grupo) un control con vehículo de PBS, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 4 mg/kg, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G20; REGN4460) a una dosis de 4 mg/kg, un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a dosis de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg, o 0,04 mg/kg, o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a dosis de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces por semana durante un total de siete dosis, y se evaluó el crecimiento tumoral a lo largo de 60 días. Mientras que los tumores NCI-H929 BCMA⁺ crecieron de forma similar en los ratones tratados con vehículo y con el control de unión a CD3, los dos Abs anti-BCMA x anti-CD3 que se sometieron a prueba impidieron el crecimiento de tumores de forma dependiente de la dosis *in vivo*.

15 *Implantación y medición de tumores xenogénicos:* A los ratones NSG se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 10×10^6 células de mieloma múltiple NCI-H929 que expresaban BCMA y $0,5 \times 10^6$ PBMC derivadas de un donante normal sano. A los ratones (n=7 por grupo) se les administró inmediatamente un control con vehículo de PBS, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D), un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G20; REGN4460), un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458), o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459). mAb17664D y REGN4460 se dosificaron a 4 mg/kg, mientras que REGN5458 y REGN5459 se administraron a 4 mg/kg, 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg. A los ratones se les administró Abs dos veces por semana durante un total de siete dosis. El crecimiento tumoral se midió con calibradores dos veces por semana durante todo el experimento.

20 *Cálculo del crecimiento y de la inhibición de tumores xenogénicos:* Con el fin de determinar el volumen tumoral con un calibrador externo, se determinó el mayor diámetro longitudinal (longitud en mm) y el mayor diámetro transversal (anchura en mm). El volumen tumoral basado en las medidas del calibrador se calculó mediante la fórmula: Volumen (mm³) = (longitud x anchura²)/2.

25 Los Abs biespecíficos BCMAxCD3 impidieron el crecimiento de tumores NCI-H929 BCMA⁺ de forma dependiente de la dosis en este modelo tumoral xenogénico *in vivo*. Los resultados se muestran en la tabla 19, a continuación, y que se ilustran en las figuras 1 y 2.

35

Tabla 19: Tamaño promedio del tumor en diferentes puntos temporales

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 4
PBS (Control de vehículo)	60,1 ± 7,9
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	42,5 ± 4,7
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	52,0 ± 5,9
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	18,0 ± 1,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	31,9 ± 2,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	32,0 ± 2,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	21,8 ± 3,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	19,6 ± 4,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	33,0 ± 4,4
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 7
PBS (Control de vehículo)	138,2 ± 25,1
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	108,6 ± 17,8
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	132,4 ± 21,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,3 ± 1,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	11,3 ± 3,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	30,8 ± 5,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	8,0 ± 4,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	7,3 ± 3,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	8,4 ± 4,0
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 12
PBS (Control de vehículo)	545,4 ± 88,7
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	493,4 ± 67,5
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	616,2 ± 84,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,6 ± 1,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	71,5 ± 22,4
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	1,7 ± 1,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	0 ± 0
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 15
PBS (Control de vehículo)	921,4 ± 147,5
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	874,8 ± 86,6
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	1190,7 ± 91,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	133,4 ± 50,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 15
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	7,9 ± 7,9
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 19
PBS (Control de vehículo)	1785,3 ± 282,2
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	1833,4 ± 186,6
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	2336,5 ± 188,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	413,7 ± 162,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	23,1 ± 23,1
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 22
PBS (Control de vehículo)	2601,5 ± 414,5
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	2878,5 ± 257,6
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	3374,3 ± 267,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	669,4 ± 248,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	69,5 ± 69,5
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 26
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1167,0 ± 431,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	156,7 ± 156,7
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 29
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 29
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1781,8 ± 620,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	226,6 ± 226,6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 34
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 39
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 42
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 46
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 46
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 55
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 60
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados

Ejemplo 12: Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA × anti-CD3 reducen el tamaño y previenen el crecimiento de tumores establecidos que expresan BCMA (NCI-H929) de forma dependiente de la dosis en un modelo tumoral xenogénico *in vivo*

5 Para determinar la eficacia *in vivo* de anticuerpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA × anti-CD3, se realizó un estudio de tumores xenogénicos. A los ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 10⁶ células tumorales humanas de mieloma múltiple NCI-H929 que expresaban BCMA y 0,5×10⁶ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas aisladas de un donante normal sano. Se dejó
10 que los tumores crecieran y se establecieran durante 5 días hasta que tuvieran un tamaño aproximado de 70 mm³. El día 5, a continuación, se administró a los ratones (n=7-8 por grupo) un control con vehículo de PBS, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 4 mg/kg, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G20; REGN4460) a una dosis de 4 mg/kg, un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a dosis de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg, o 0,04 mg/kg, o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a dosis de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg.
15 A los ratones se les administraron estos Abs dos veces por semana durante un total de siete dosis, y se evaluó el crecimiento tumoral a lo largo de 55 días. Mientras que los tumores NCI-H929 BCMA⁺ crecieron de forma similar en

los ratones tratados con vehículo y con el control de unión a CD3, ambos Abs BCMAxCD3 que se sometieron a prueba redujeron los tumores establecidos e impidieron el crecimiento de tumores de forma dependiente de la dosis *in vivo*.

- 5 *Implantación y medición de tumores xenogénicos:* A los ratones NSG se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 10×10^6 células de mieloma múltiple NCI-H929 que expresaban BCMA y $0,5 \times 10^6$ PBMC derivadas de un donante normal sano. Se dejó que los tumores crecieran y se establecieran durante 5 días hasta que tuvieran un tamaño aproximado de 70 mm^3 . El día 5, a continuación, se administró a los ratones (n=7-8 por grupo) un control con vehículo de PBS, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D), un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G20; REGN4460), un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458), o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459). mAb17664D y REGN4460 se dosificaron a 4 mg/kg, mientras que REGN5458 y REGN5459 se administraron a 4 mg/kg, 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg. A los ratones se les administró Abs dos veces por semana durante un total de siete dosis. El crecimiento tumoral se midió con calibradores dos veces por semana durante todo el experimento.
- 10
- 15 *Cálculo del crecimiento y de la inhibición de tumores xenogénicos:* Con el fin de determinar el volumen tumoral con un calibrador externo, se determinó el mayor diámetro longitudinal (longitud en mm) y el mayor diámetro transversal (anchura en mm). El volumen tumoral basado en las medidas del calibrador se calculó mediante la fórmula: Volumen (mm^3) = (longitud \times anchura²)/2.
- 20 Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA \times anti-CD3 redujeron el tamaño de e impidieron el crecimiento de tumores NCI-H929 BCMA⁺ establecidos de forma dependiente de la dosis en este modelo tumoral xenogénico *in vivo*. Los resultados se muestran en la tabla 20, a continuación, y que se ilustran en las figuras 3 y 4.

Tabla 20: Tamaño promedio del tumor en diferentes puntos temporales

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 5
PBS (Control de vehículo)	61,5 \pm 6,4
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	63,7 \pm 5,4
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	62,6 \pm 3,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	71,9 \pm 10,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	69,3 \pm 7,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	58,1 \pm 5,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	61,8 \pm 5,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	69,5 \pm 4,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	74,9 \pm 6,4
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 8
PBS (Control de vehículo)	124,3 \pm 17,3
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	145,3 \pm 22,0
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	170,7 \pm 15,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	64,7 \pm 16,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	120,3 \pm 16,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	130,3 \pm 16,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	45,8 \pm 9,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	171,9 \pm 23,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	152,3 \pm 20,0
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm^3) \pm SEM el día 12
PBS (Control de vehículo)	565,7 \pm 64,7
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	585,0 \pm 64,4
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	706,8 \pm 46,3

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 12
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	19,5 ± 10,9
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	262,7 ± 61,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	525,9 ± 71,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	11,5 ± 8,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	233,8 ± 63,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	462,5 ± 57,7
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 15
PBS (Control de vehículo)	1150,4 ± 105,7
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	1041,4 ± 101,3
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	1298,4 ± 71,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	25,6 ± 19,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	476,2 ± 133,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1031,2 ± 164,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	327,2 ± 135,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	1094,2 ± 78,9
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 19
PBS (Control de vehículo)	2621,3 ± 190,9
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	2557,5 ± 241,1
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	3383,3 ± 183,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	40,6 ± 32,8
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1347,5 ± 334,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2467,5 ± 370,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	606,2 ± 288,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	2412,5 ± 184,6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 22
PBS (Control de vehículo)	3717,9 ± 214,5
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	3688,9 ± 272,0
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	4492,2 ± 344,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	78,3 ± 60,8
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	2068,5 ± 465,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	3745,7 ± 541,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	815,4 ± 387,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	3285,9 ± 227,3
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 27
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 27
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	252,3 ± 185,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	3463,9 ± 1025,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1589,1 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	1849,9 ± 903,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 30
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	411,3 ± 307,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	2144,2 ± 2144,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2886,5 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	661,8 ± 490,1
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 35
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	633,5 ± 473,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	996,8 ± 771,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 40
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	369,5 ± 369,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	375,6 ± 375,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 55
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados

Ejemplo 13: Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA × anti-CD3 impiden el crecimiento de tumores que expresan BCMA (MOLP-8) de forma dependiente de la dosis en un modelo tumoral xenogénico *in vivo*

- 5 Para determinar la eficacia *in vivo* de anticuerpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA × anti-CD3, se realizó un estudio de tumores xenogénicos. A los ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 5×10⁶ células tumorales humanas de mieloma múltiple MOLP-8 que expresaban BCMA y 1×10⁶ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas aisladas de un donante normal sano. A continuación, se administró inmediatamente a los ratones (n=7 por grupo) un control con vehículo de PBS, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 4 mg/kg, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G20; REGN4460) a una dosis de 4 mg/kg, un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a dosis de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg, o 0,04 mg/kg, o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a dosis de 4 mg/kg, 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces por semana durante un total de siete dosis, y se evaluó el crecimiento tumoral a lo largo de 56 días. Mientras que los tumores MOLP-8 BCMA⁺ crecieron de forma similar en los ratones tratados con vehículo y con el control de unión a CD3, los dos Abs BCMAxCD3 que se sometieron a prueba impidieron el crecimiento de tumores de forma dependiente de la dosis *in vivo*.

15 *Implantación y medición de tumores xenogénicos:* A los ratones NSG se les implantó por vía subcutánea una mezcla de 5×10⁶ células de mieloma múltiple MOLP-8 que expresaban BCMA y 1×10⁶ PBMC derivadas de un donante normal sano. A los ratones (n=7 por grupo) se les administró inmediatamente un control con vehículo de PBS, un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D), un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G20; REGN4460), un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458), o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459). mAb17664D y REGN4460 se dosificaron a 4 mg/kg, mientras que REGN5458 y REGN5459 se administraron a 4 mg/kg, 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg. A los ratones se les administró Abs dos veces por semana durante un total de siete dosis. El crecimiento del tumor se midió con un calibrador dos veces por semana durante todo el experimento.

20 *Cálculo del crecimiento y de la inhibición de tumores xenogénicos:* Con el fin de determinar el volumen tumoral con un calibrador externo, se determinó el mayor diámetro longitudinal (longitud en mm) y el mayor diámetro transversal (anchura en mm). El volumen tumoral basado en las medidas del calibrador se calculó mediante la fórmula: Volumen (mm³) = (longitud × anchura²)/2.

25 Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA × anti-CD3 impidieron el crecimiento de tumores MOLP-8 BCMA⁺ de forma dependiente de la dosis en este modelo tumoral xenogénico *in vivo*. Los resultados se muestran en la tabla 21, a continuación, y que se ilustran en las figuras 5 y 6.

Tabla 21: Tamaño promedio del tumor en diferentes puntos temporales

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 3
PBS (Control de vehículo)	10,3 ± 3,0
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	11,6 ± 2,0
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	14,1 ± 3,9
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	12,5 ± 1,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	13,5 ± 1,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	9,3 ± 2,4

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	12,9 ± 1,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	14,0 ± 1,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	11,7 ± 2,1
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 7
PBS (Control de vehículo)	73,4 ± 13,5
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	50,0 ± 6,6
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	45,7 ± 6,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,0 1,0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	18,3 ± 5,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0,6 ± 0,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	37,0 ± 5,7
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 10
PBS (Control de vehículo)	249,9 ± 47,6
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	125,0 ± 6,8
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	173,9 ± 99
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	73,9 ± 25,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	104 ± 23,0
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 14
PBS (Control de vehículo)	677,0 ± 62,7
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	530,0 ± 44,6
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	549,1 ± 59,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	255,4 ± 79,7
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	356,7 ± 84,6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 17
PBS (Control de vehículo)	1349,5 ± 149,7
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	935,3 ± 71,3
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	1027,1 ± 86,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	14,5 ± 7,3

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 17
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,7 ± 1,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	494,3 ± 144,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	645,6 ± 140,9
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 21
PBS (Control de vehículo)	2990,9 ± 291,7
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	2249,6 ± 113,5
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	2473,4 ± 170,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	102,7 ± 66,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,3 ± 5,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1373,0 ± 366,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	1442,4 ± 310,7
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 23
PBS (Control de vehículo)	4155,1 ± 401,8
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	3288,4 ± 204,6
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	3592,7 ± 224,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	193,3 ± 117,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	9,7 ± 9,7
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	1882,3 ± 551,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	2124,4 ± 444,1
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 28
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	627,4 ± 318,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	47,4 ± 47,4
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2542,5 ± 613,3
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	1,9 ± 1,9
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	1939,3 ± 840,6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 31
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 31
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1018,5 ± 498,3
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	104,7 ± 92,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	2906,1 ± 532,6
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	3,8 ± 3,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	2688,7 ± 1176,6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 35
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1342,9 ± 629,6
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	375,1 ± 307,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	3538,0 ± 0,0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	9,3 ± 7,5
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	612,1 ± 0
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 42
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	2363,0 ± 890,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	968,8 ± 689,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	12,8 ± 12,8
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 49
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1683,5 ± 1683,5
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	Sin registro
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	Sin registro
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	Sin registro
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 56
PBS (Control de vehículo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN4460 (Control de unión a CD3-G20) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	3108,1 ± 3108,1
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1742,4 ± 635,2
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 4 mg/kg	17,2 ± 17,2
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	0 ± 0
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,04 mg/kg	Animales sacrificados

Ejemplo 14: Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA × anti-CD3 retrasan el crecimiento de tumores que expresan BCMA (MOLP-8) en un modelo tumoral xenográfico *in vivo*

- 5 Para determinar la eficacia *in vivo* de anticuerpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA × anti-CD3, se realizó un estudio de tumores xenogénicos. El día -11, a los ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) se les inyectaron por vía intraperitoneal 4×10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas procedentes de un donante normal sano. El día 0, a los ratones se les administraron por vía intravenosa 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple humano BCMA⁺ MOLP-8 que se modificaron para que también expresaran luciferasa de luciérnaga (células MOLP-8-luciferasa). A continuación, se administró inmediatamente a los ratones (n=5 por grupo) un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 4 mg/kg o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a una dosis de 4 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces más en los días 3 y 7, para un total de tres dosis. El crecimiento del tumor se evaluó durante 48 días midiendo la bioluminiscencia (BLI) tumoral en animales anestesiados. Como control positivo, un grupo de ratones (n=5) recibió únicamente células MOLP-8-luciferasa, pero no PBMC ni anticuerpos. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones (n=5) no recibió tratamiento y no recibió tumores, PBMC ni anticuerpo. Mientras que los tumores BCMA⁺ MOLP-8-luciferasa crecieron progresivamente en los ratones tratados con el control de unión a CD3, el tratamiento de BCMAxCD3 Ab con REGN5458 retrasó el crecimiento de tumores *in vivo*.
- 10
- 15
- 20 *Implantación y medición de tumores xenogénicos:* El día -11, a los ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) se les inyectaron por vía intraperitoneal 5×10^6 PBMC humanas procedentes de un donante normal sano. El día 0, a los ratones se les administraron por vía intravenosa 2×10^6 células BCMA⁺ MOLP-8-luciferasa. A continuación, se administró inmediatamente a los ratones (n=5 por grupo) un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 4 mg/kg o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a una dosis de 4 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces más en los días 3 y 7, para un total de tres dosis. El crecimiento tumoral se evaluó durante 48 días midiendo el BLI tumoral en animales anestesiados. Como control positivo, un grupo de ratones (n=5) recibió únicamente células MOLP-8-luciferasa, pero no PBMC ni anticuerpos. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones (n=5) no recibió tratamiento y no recibió tumores, PBMC ni anticuerpo.
- 25
- 30 *Medición del crecimiento de tumores xenogénicos:* Para medir la carga tumoral se utilizaron imágenes de BLI. Los ratones recibieron una inyección IP de 150 mg/kg del sustrato de luciferasa D-luciferina suspendido en PBS. Cinco minutos después de esta inyección, se tomaron imágenes BLI de los ratones bajo anestesia con isoflurano mediante el sistema Xenogen IVIS. La adquisición de imágenes se llevó a cabo con el campo de visión en D, a una altura del sujeto de 1,5 cm y un nivel de agrupación medio con un tiempo de exposición automático determinado por el programa informático Living Image. Las señales de las BLI se extrajeron utilizando el programa informático Living Image: se dibujaron regiones de interés alrededor de cada masa tumoral y se registraron las intensidades de los fotones como p/s/cm²/sr.
- 35
- 40 El anticuerpo biespecífico anti-BCMA × anti-CD3 REGN5458 retrasó el crecimiento de tumores BCMA⁺ MOLP-8-luciferasa en este modelo tumoral xenogénico *in vivo*. Los resultados se muestran en la tabla 22, a continuación.

Tabla 22: Tamaño promedio del tumor (por radiancia) en diferentes puntos temporales

Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 8 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	4,93E+05 ± 1,66E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	5,73E+05 ± 5,27E+04

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 8 días después de la implantación (media ± SEM)
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	6,08E+05 ± 5,16E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	5,66E+05 ± 1,97E+04
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 15 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,37E+05 ± 1,46E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	1,24E+06 ± 9,67E+04
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	1,61E+06 ± 9,64E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	5,28E+05 ± 4,13E+04
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 22 días después de la implantación (media ± ETM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,00E+05 ± 1,03E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	1,23E+07 ± 1,02E+06
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	1,98E+07 ± 8,86E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,08E+06 ± 1,71E+05
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 24 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,24E+05 ± 1,86E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	1,56E+07 ± 1,29E+06
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	5,26E+07 ± 1,91E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,02E+06 ± 1,99E+05
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 28 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,09E+05 ± 2,28E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	3,01E+07 ± 4,78E+06
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	5,69E+07 ± 2,77E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	3,56E+06 ± 6,34E+05
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 30 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,44E+05 ± 4,56E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	6,92E+06 ± 1,40E+06
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 34 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,78E+05 ± 3,02E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	2,65E+07 ± 1,36E+07
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 37 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,59E+05 ± 2,96E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados

Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 37 días después de la implantación (media ± SEM)
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	4,52E+07 ± 1,40E+07
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 43 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,26E+05 ± 4,18E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	1,06E+08 ± 3,43E+07
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm ² /sr] 48 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	8,24E+05 ± 1,73E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 4 mg/kg	3,22E+08 ± 1,27E+08

Ejemplo 15: Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA × anti-CD3 reducen la carga tumoral (OPM-2) a niveles de fondo *in vivo*

5 Para determinar la eficacia *in vivo* de anticuerpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA × anti-CD3, se realizó un estudio de tumores xenogénicos. El día 0, a los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) inmunodeficientes se les administró por vía intravenosa 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple humano OPM-2 BCMA⁺ que se diseñaron para expresar también luciferasa de luciérnaga (células OPM-2-luciferasa). El día 10, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 4×10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas procedentes de un donante normal sano. El día 21, a los ratones (n=5 por grupo) se les administró un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 0,4 mg/kg, un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a 0,4 mg/kg, o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a 0,4 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces más en los días 25 y 28, para un total de tres dosis. El crecimiento del tumor se evaluó hasta el día 61 midiendo la bioluminiscencia (BLI) tumoral en animales anestesiados. Como control positivo, un grupo de ratones (n=5) recibió únicamente células OPM-2-luciferasa, pero no PBMC ni anticuerpos. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones (n=5) no recibió tratamiento y no recibió tumores, PBMC ni anticuerpo. Mientras que los tumores BCMA⁺ OPM-2-luciferasa crecieron progresivamente en los ratones tratados con el control de unión a CD3, El tratamiento de Ab BCMAxCD3 con REGN5458 y REGN5459 redujo la carga tumoral a niveles de fondo en la mayoría de los animales.

20 *Implantación y medición de tumores xenogénicos:* El día 0, a los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) inmunodeficientes se les administró por vía intravenosa 2×10^6 células tumorales de mieloma múltiple humano OPM-2 BCMA⁺ que se diseñaron para expresar también luciferasa de luciérnaga (células OPM-2-luciferasa). El día 10, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 4×10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas procedentes de un donante normal sano. El día 21, a los ratones (n=5 por grupo) se les administró un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 0,4 mg/kg, un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a 0,4 mg/kg, o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G20; REGN5459) a 0,4 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces más en los días 25 y 28, para un total de tres dosis. El crecimiento del tumor se evaluó hasta el día 61 midiendo la bioluminiscencia (BLI) tumoral en animales anestesiados. Como control positivo, un grupo de ratones (n=5) recibió únicamente células OPM-2-luciferasa, pero no PBMC ni anticuerpos. Para medir los niveles de BLI de fondo, un grupo de ratones (n=5) no recibió tratamiento y no recibió tumores, PBMC ni anticuerpo.

35 *Medición del crecimiento de tumores xenogénicos:* Para medir la carga tumoral se utilizaron imágenes de BLI. Los ratones recibieron una inyección IP de 150 mg/kg del sustrato de luciferasa D-luciferina suspendido en PBS. Cinco minutos después de esta inyección, se tomaron imágenes BLI de los ratones bajo anestesia con isoflurano mediante el sistema Xenogen IVIS. La adquisición de imágenes se llevó a cabo con el campo de visión en D, a una altura del sujeto de 1,5 cm y un nivel de agrupación medio con un tiempo de exposición automático determinado por el programa informático Living Image. Las señales de las BLI se extrajeron utilizando el programa informático Living Image: se dibujaron regiones de interés alrededor de cada masa tumoral y se registraron las intensidades de los fotones como p/s/cm²/sr.

40 Mientras que los tumores BCMA⁺ OPM-2-luciferasa crecieron progresivamente en los ratones tratados con el control de unión a CD3, El tratamiento de Ab BCMAxCD3 con REGN5458 y REGN5459 redujo la carga tumoral a niveles de

fondo en la mayoría de los animales. Los resultados se muestran en la tabla 23, que se ilustra en la figura 7.

Tabla 23: Tamaño promedio del tumor (por radiancia) en diferentes puntos temporales

Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 5 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,22E+05 ± 2,77E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	5,62E+05 ± 2,75E+04
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	5,73E+05 ± 3,02E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,87E+05 ± 2,40E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	5,09E+05 ± 3,56E+04
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 11 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,90E+05 ± 3,64E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	6,22E+05 ± 3,34E+04
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	6,25E+05 ± 3,80E+04
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	6,19E+05 ± 4,39E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	6,45E+05 ± 2,39E+04
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 20 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,59E+05 ± 5,82E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	2,32E+06 ± 2,94E+05
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	2,36E+06 ± 5,46E+05
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,81E+06 ± 2,37E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	2,13E+06 ± 1,69E+05
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 26 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,51E+05 ± 2,51E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	5,96E+06 ± 8,74E+05
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	6,05E+06 ± 1,32E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,73E+06 ± 8,69E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	1,28E+06 ± 7,36E+05
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 31 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,62E+05 ± 3,35E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	1,58E+07 ± 4,84E+06
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	1,35E+07 ± 2,35E+06
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	3,50E+06 ± 2,42E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	1,98E+06 ± 1,36E+06
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 34 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	4,57E+05 ± 1,04E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	3,36E+07 ± 1,27E+07
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg.	2,35E+07 ± 5,72E+06

Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 34 días después de la implantación (media ± SEM)
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	4,85E+06 ± 3,24E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	4,24E+06 ± 3,69E+06
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 38 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,60E+05 ± 3,13E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	3,91E+07 ± 6,87E+06
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	4,84E+07 ± 1,65E+07
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,30E+06 ± 3,44E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	3,21E+06 ± 2,52E+06
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 40 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	5,39E+05 ± 9,67E+03
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,06E+06 ± 3,36E+06
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	3,84E+06 ± 3,34E+06
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 47 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,73E+05 ± 1,91E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	7,76E+05 ± 7,85E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	7,34E+05 ± 2,62E+04
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 54 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	7,49E+05 ± 1,95E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,78E+05 ± 1,15E+05
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	6,41E+05 ± 5,96E+04
Tratamiento con anticuerpos	Radiancia [p/s/cm²/sr] 61 días después de la implantación (media ± SEM)
Sin tumor (BLI de fondo)	6,18E+05 ± 2,77E+04
Sin PBMC/Anticuerpo (control positivo)	Animales sacrificados
mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	Animales sacrificados
REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	5,23E+05 ± 4,10E+04
REGN5459 (BCMAxCD3-G20) - 0,4 mg/kg	6,03E+05 ± 5,29E+04

Ejemplo 16: Los anticuerpos biespecíficos BCMA×CD3 suprimen el crecimiento de tumores sinérgicos *in vivo* de forma dependiente de la dosis

- 5 Para determinar la eficacia *in vivo* de anticuerpos biespecíficos (Abs) anti-BCMA × anti-CD3, se realizó un estudio de tumores sinérgicos en ratones que expresaban CD3 humano. ratones C57BL/6 que expresaban CD3deg humano en

lugar de CD3deg murino (ratones humanizados con CD3) fueron implantados subcutáneamente con $0,5 \times 10^6$ células de melanoma B16 que han sido modificadas para expresar BCMA humano de longitud completa (células B16/BCMA) o 1×10^6 células de carcinoma de colon MC38 que han sido modificadas para expresar BCMA humano de longitud completa (MC38/BCMA). A continuación, se administró inmediatamente a los ratones (n=7 por grupo) un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 0,4 mg/kg o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a dosis de 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces más los días 4 y 7 para un total de tres dosis, y se evaluó el crecimiento tumoral a lo largo del experimento. Mientras que los tumores B16/BCMA y los tumores MC38/BCMA crecieron en los ratones tratados con el control de unión a CD3, REGN5458 BCMAxCD3 fue capaz de suprimir el crecimiento de ambas líneas tumorales de forma dependiente de la dosis *in vivo*.

Implantación y medición de tumores singénicos: ratones C57BL/6 que expresaban CD3deg humano en lugar de CD3deg murino (ratones humanizados con CD3) fueron implantados subcutáneamente con $0,5 \times 10^6$ células de melanoma B16F10 que han sido modificadas para expresar BCMA humano de longitud completa (células B16/BCMA) o 1×10^6 células de carcinoma de colon MC38 que han sido modificadas para expresar BCMA humano de longitud completa (MC38/BCMA). A continuación, se administró inmediatamente a los ratones (n=7 por grupo) un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; mAb17664D) a una dosis de 0,4 mg/kg o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a dosis de 0,4 mg/kg o 0,04 mg/kg. A los ratones se les administraron estos Abs dos veces más los días 4 y 7 para un total de tres dosis, y se evaluó el crecimiento tumoral a lo largo del experimento.

Cálculo del crecimiento y de la inhibición de tumores singénicos: Con el fin de determinar el volumen tumoral con un calibrador externo, se determinó el mayor diámetro longitudinal (longitud en mm) y el mayor diámetro transversal (anchura en mm). El volumen tumoral basado en las medidas del calibrador se calculó mediante la fórmula: Volumen (mm^3) = (longitud \times anchura²)/2.

Mientras que los tumores B16/BCMA y los tumores MC38/BCMA crecieron en los ratones tratados con el control de unión a CD3, REGN5458 BCMAxCD3 fue capaz de suprimir el crecimiento de ambas líneas tumorales de forma dependiente de la dosis *in vivo*. Los resultados se muestran en la tabla 24, a continuación.

Tabla 24: Tamaño promedio del tumor en diferentes puntos temporales

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) \pm SEM el día 5
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	25,6 \pm 2,7
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0,0 \pm 0,0
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	3,3 \pm 2,2
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	29,3 \pm 4,4
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	1,4 \pm 1,4
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	11,9 \pm 2,9
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) \pm SEM el día 10
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	179,2 \pm 30,6
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0,0 \pm 0,0
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	15,4 \pm 12,5
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	123,1 \pm 14,6
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	0,0 \pm 0,0
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	66,7 \pm 22,5
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) \pm SEM el día 14
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	763,1 \pm 156,2
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	8,1 \pm 4,4
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	81,4 \pm 49,2
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	477,1 \pm 77,1

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 14
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	2,9 ± 2,9
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	273,3 ± 115,3
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 18
Tumor B16/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	2068,9 ± 357,7
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	47,1 ± 17,0
Tumor B16/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	127,2 ± 63,9
Tumor MC38/BCMA mAb17664D (Control de unión a CD3-G) - 0,4 mg/kg	1432,5 ± 231,6
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,4 mg/kg	7,5 ± 7,5
Tumor MC38/BCMA REGN5458 (BCMAxCD3-G) - 0,04 mg/kg	641,5 ± 309,8

Ejemplo 17: Cartografía del epítipo de la unión de REGN5458 a BCMA mediante intercambio de hidrógeno/deuterio

5 Se realizó una cartografía de epítipos por intercambio H/D con espectrometría de masas (HDX-MS) para determinar los restos de aminoácidos de BCMA (BCMA humano recombinante, secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 115) que interactúan con REGN5458 (anticuerpo biespecífico BCMA × CD3). Se expone una descripción general del método de intercambio de H/D en, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; y Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

10 Los experimentos de HDX-MS se realizaron en una plataforma integrada HDX/MS, que consiste en un sistema Leaptec HDX PAL para el marcaje de deuterio e inactivación, un Waters Acquity M-Class (administrador auxiliar de disolventes) para la digestión y carga de muestras, un Waters Acquity M-Class (gestor de disolventes μBinary) para el gradiente analítico, y espectrómetro de masas Thermo Q Exactive HF para la medición de la masa peptídica.

15 La solución de marcaje se preparó como tampón PBS en D₂O a pD 7,0 (tampón fosfato 10 mM, NaCl 140 mM y KCl 3 mM, equivalente a pH 7,4 a 25 °C). Para el marcaje de deuterio, 10 μl de hBCMA.hFc (REGN2746, 54,5 μM; SEQ ID NO: 120 o hBCMA.hFc premezclado con REGN5458 en proporción molar 1:2 (complejo Ag-Ab) se incubó a 20 °C con 90 μl de solución de marcaje D₂O durante varios puntos temporales por duplicado (por ejemplo, Control no deuterado = 0 segundos; marcaje de deuterio durante 5 minutos y 10 minutos). La reacción de deuteración se inactivó añadiendo 100 μl de tampón de inactivación previamente enfriado (TCEP-HCl 0,5 M, urea 8 M y ácido fórmico al 1 %) a cada muestra para una incubación de 5 minutos a 20 °C. A continuación, la muestra se inyectó en un Waters HDX Manager para la digestión en línea con pepsina/proteasa XIII. Los péptidos digeridos se separaron mediante una columna C8 (1,0 mm × 50 mm, NovaBioassays) con un gradiente de 13 minutos del 10 %-32 % de B (fase móvil A: ácido fórmico al 0,5 % en agua, fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). Los péptidos eluidos se analizaron mediante espectrometría de masas Q Exactive HF en modo LC-MS/MS o LC-MS.

20 Los datos de LC-MS/MS de la muestra de BCMA no deuterada se buscaron en una base de datos que incluía BCMA y su secuencia aleatoria utilizando el motor de búsqueda Byonic (Protein Metrics). Los parámetros de búsqueda (en ELN) se establecieron por defecto utilizando la digestión enzimática no específica y la glicosilación humana como modificación variable común. A continuación, la lista de péptidos identificados se importó en el software HDX Workbench (versión 3.3) para calcular la captación de deuterio de cada péptido detectado por LC-MS a partir de todas las muestras deuteradas. Para un péptido dado, la masa centroide (masa promedio ponderada por intensidad) en cada punto temporal se utilizó para calcular la captación de deuterio (D) y el porcentaje de captación de deuterio (%D):

35

$$\begin{aligned}
 \text{Captación de deuterio (captación de D)} &= \frac{\text{Masa promedio (deuterada)} - \text{Masa promedio (no deuterada)}}{\text{Captación de D para péptido en cada punto temporal} \times 100 \%} \\
 \text{Porcentaje de captación de deuterio (\%D)} &= \frac{\text{Captación de D máxima del péptido (definida en ELN)}}{\text{Captación de D para péptido en cada punto temporal} \times 100 \%}
 \end{aligned}$$

Se identificaron un total de 8 péptidos de hBCMA.hFc tanto de muestras de hBCMA.hFc sola como de hBCMA.hFc en complejo con REGN5458, que representa una cobertura de secuencia del 100 % de hBCMA. La desviación estándar

(DE) promedio de todos los péptidos se evaluó en un 1,4 % (los cálculos detallados se definieron en ELN y Pascal, BD et al (2012) Journal of the American Society for Mass Spectrometry 23(9):1512-1521). Por lo tanto, se definió como significativamente protegido cualquier péptido que presentara unos valores diferenciales de porcentaje de captación de D superiores al 4,2 % (el triple de la DE promediada). Para hBCMA.hFc, los péptidos que corresponden a los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 106 (MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSNTPPLTCQRYCNA; SEQ ID NO: 121) estaban significativamente protegidos por REGN5458. La protección de estos restos por REGN5458 se confirmó utilizando hBCMA.mmH (REGN2744, secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106).

Tabla 25: Péptidos BCMA.hFc seleccionados con protección significativa tras la unión a REGN5458

Restos de BCMA	5 min			10 min			-hFc
	REGN2746	REGN2746 + REGN5458		REGN2746	REGN2746 + REGN5458		
	MH ⁺ centroide	MH ⁺ centroide	ΔD	MH ⁺ centroide	MH ⁺ centroide	ΔD	Δ%D
1-28	3217,16	3212,39	- 4,77	3218,05	3212,62	- 5,43	-25,2
4-26	2582,03	2577,26	- 4,77	2582,71	2577,45	- 5,26	-31
27-43	1921,75	1920,69	- 1,06	1922,1	1920,83	- 1,27	-11,1

Ejemplo 18: Ensayo de unión de FACS de anticuerpos biespecíficos BCMAxCD3 y anticuerpos BCMA adicionales en líneas celulares de mieloma múltiple tras incubación durante la noche con anticuerpos anti-BCMA

Se utilizó el análisis de citometría de flujo para determinar el impacto de la incubación durante una noche de líneas celulares de mieloma múltiple con anticuerpos anti-BCMA sobre el nivel de BCMA de superficie. Las líneas celulares de MM (H929, Molp8, U266 y MM1.S) se lavaron dos veces y se cultivaron a 37 °C en medio R10 (RPMI+FBS al 10 % + pen/strep/glut) que contenía 66,7 o 667 nM de anticuerpos anti-BCMA, DAPT (un inhibidor de la gamma-secretasa) o solo medio. Al cabo de 18 horas, los pocillos se lavaron con lavado de FACS frío (PBS+ FBS filtrado al 1 %) y se resuspendieron en 667 nM del mismo anticuerpo anti-BCMA en tampón de tinción frío (Miltenyi 130-091-221) durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con lavado de FACS frío (PBS + FBS filtrado al 1 %) y el anticuerpo unido se detectó incubando con el anticuerpo secundario antihumano apropiado (anti-hlgG o anti-HIS) en hielo durante 30-45 minutos más. Después de la incubación, las células se lavaron, se volvieron a suspender en 200 µl de PBS frío que contenía FBS filtrado al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo en un BD FACS Canto II. El incremento de la tinción se calculó dividiendo la MFI de las células teñidas previamente incubadas durante la noche en abs BCMA o DAPT por la MFI de las células teñidas que se incubaron durante la noche solo en medio.

La enzima gamma-secretasa escinde rápidamente el BCMA de la superficie de las células. La incubación durante la noche con los inhibidores de la gamma-secretasa, tales como DAPT, impide la escisión de BCMA, lo que provoca un aumento de los niveles de BCMA en la superficie celular. En las Tablas 26-29 se muestra el aumento del doble de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de BCMA en células incubadas durante la noche en anticuerpos anti-BCMA o DAPT en comparación con células incubadas únicamente en medio. Observamos que la incubación de una noche con DAPT aumentaba los niveles de BCMA detectados por anticuerpos anti-BCMA (biespecífico BCMAxCD3 R5458, el anticuerpo BCMA parental mAb15281 y otros anticuerpos BCMA internos) en H929, Molp8, U266 y MM.1S, 2,3-4 veces, 2,4-8,6 veces, 5,3-9,0 veces, y 11,9 veces, respectivamente.

Cabe destacar que, también observamos que la incubación durante una noche de líneas celulares de MM con 66,7 o 667 nM de REGN5458 o el anticuerpo bivalente anti-BCMA parental mAb21581 producía de forma similar un aumento de los niveles de BCMA de superficie detectados por FACS, lo que sugiere que la unión de anticuerpos anti-BCMA impide la escisión de BCMA por la gamma-secretasa. Los aumentos de BCMA superficial inducidos por anticuerpos difirieron según la línea celular, con mayores incrementos de pliegues en las células Molp8 y MM1S en comparación con las H929 o U266. El fenómeno no se limitaba al REGN5458, como también se observó con otros anticuerpos BCMA internos.

Tabla 26: Cambio de veces de MFI con respecto a las células incubadas sólo en medio (NCI-H929)

NCI-H929		67 nM		667 nM		DAPT	
		Promedio	n	Promedio	n	Promedio	n
mAb21581	aBCMA (progenitor de R5458)	1,2	5	1,4	3	3,5	6
REGN5458	BCMAxCD3	2,0	3	3,0	1	4,0	3

NCI-H929		67 nM		667 nM		DAPT	
		Promedio	n	Promedio	n	Promedio	n
mAb16749	aBCMA	1,0	2	0,8	1	2,3	3
mAb16711	aBCMA	2,8	2	2,1	1	3,8	3
mAb16747	aBCMA	1,8	2	2,1	1	3,9	3
REGN960	scFv IsoC	1,0	2	1,1	1	1,1	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,0	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1,3	2	1,0	1	1,1	3

Tabla 27: Cambio de veces de MFI con respecto a las células incubadas sólo en medio (Molp8)

Molp8		67 nM		667 nM		DAPT	
		Promedio	n	Promedio	n	Promedio	n
mAb21581	aBCMA (progenitor de R5458)	2,3	5	3,7	3	6,3	6
REGN5458	BCMAxCD3	2,3	3	4,5	1	8,6	3
mAb16749	aBCMA	1,1	2	3,4	1	4,0	3
mAb16711	aBCMA	3,5	2	3,0	1	5,1	3
mAb16747	aBCMA	2,2	2	0,6	1	6,2	3
REGN960	scFv IsoC	1,1	2	1,0	1	1,0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,3	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	0,9	2	1,2	1	1,0	3

Tabla 28: Cambio de veces de MFI con respecto a las células incubadas sólo en medio (U266)

U266		67 nM		667 nM		DAPT	
		Promedio	n	Promedio	n	Promedio	n
mAb21581	aBCMA (progenitor de R5458)	1,8	2	2,3	1	6,7	6
REGN5458	BCMAxCD3	1,4	2	2,3	1	9,0	3
mAb16749	aBCMA	1,3	2	1,2	1	5,3	3
mAb16711	aBCMA	2,2	2	2,2	1	7,2	3
mAb16747	aBCMA	1,5	2	1,7	1	8,3	3
REGN960	scFv IsoC	1,0	2	1,0	1	1,0	3
mAb11810	IgG1 IsoC	1,0	2	1,1	1	1,1	3
mAb11810	IgG4s IsoC	1,1	2	1,1	1	1,4	3

5

Tabla 29: Cambio de veces de MFI con respecto a las células incubadas sólo en medio (MM1S)

MM1S		67 nM		667 nM		DAPT	
		Promedio	n	Promedio	n	Promedio	n
mAb21581	aBCMA (progenitor de R5458)	7,3	2	7,0	2	11,9	2

Ejemplo 19: Eliminación de células plasmáticas humanas y de mono macaco cangrejero mediada por linfocitos T autólogos en presencia de anticuerpos biespecíficos BCMAxCD3

10

La destrucción específica de células plasmáticas humanas o de mono macaco cangrejero CD138⁺ enriquecidas por linfocitos T autólogos no estimulados se evaluó mediante citometría de flujo. Los aspirados de médula ósea humana o de macaco cangrejero y la sangre se suministraron en las 24 horas siguientes a la extracción. Las células plasmáticas

CD138⁺ se enriquecieron a partir de médula ósea mediante selección positiva utilizando el kit EasySep Human CD138⁺ Positive Selection siguiendo las instrucciones del fabricante. Las PBMC de sangre total se aislaron por separación de densidades. Las PBMC se marcaron con 1µM de colorante de seguimiento fluorescente Vybrant CFDA-SE. Después del marcaje, se sembraron 1×10⁴ células plasmáticas CD138⁺ enriquecidas en placas de 96 pocillos de fondo redondo en una relación E:T de 10:1 con PBMC marcadas con Vybrant CFDA-SE y diluciones seriadas de REGN5458, BsAb de control de unión a CD3, o mAb de control de unión a BCMA durante 72 horas a 37 °C en medio completo. Al final del cultivo, las células plasmáticas CD138⁺ supervivientes se analizaron mediante citometría de flujo, utilizando colorante fijable LIVE/DEAD y marcadores de superficie celular específicos de células plasmáticas. El porcentaje de viabilidad se normalizó con respecto a la condición de control (células plasmáticas solo en presencia de PBMC). La activación de los linfocitos T se evaluó mediante citometría de flujo. La activación se expresa como el porcentaje de linfocitos T CD2⁺/CD4⁺ o CD2⁺/CD8⁺/CD16⁻ que expresan CD25. El porcentaje de activación de linfocitos T se normalizó con respecto a la condición de control (células plasmáticas solo en presencia de PBMC).

Los estudios *in vitro* evaluaron el efecto de REGN5458 o de controles negativos (mAb de control de unión a BCMA o bsAb de control de unión a CD3) sobre la activación de linfocitos T primarios humanos y de mono macaco cangrejero y la citotoxicidad de células plasmáticas autólogas. Los valores de CE₅₀ de citotoxicidad y el porcentaje de activación de linfocitos T para cada donante se resumen en la Tabla 30.

REGN5458 mediaba la citotoxicidad de células plasmáticas humanas primarias de los donantes 1 y 2 en presencia de linfocitos T autólogos de forma dependiente de la concentración, con valores de CE₅₀ de 42,8 pM y 191 pM, respectivamente, y dieron lugar a un porcentaje máximo de citotoxicidad del 91 % y el 89 %, respectivamente. En paralelo, REGN5458 mediaba la activación de linfocitos T en presencia de células plasmáticas humanas de los donantes 1 y 2 de forma dependiente de la concentración, con valores de CE₅₀ de 214 pM y 860 pM para la activación de linfocitos T CD8⁺, respectivamente, y un porcentaje máximo de activación de linfocitos T CD8⁺ del 2 % y el 36 %, respectivamente. Se observó citotoxicidad de las células plasmáticas en ambos donantes y una mayor activación de los linfocitos T CD8⁺ solo en el donante 2 a concentraciones nanomolares del control de unión a CD3. No se observó ningún efecto sobre la citotoxicidad o la activación de linfocitos T con el control de unión a BCMA en ninguna de las concentraciones sometidas a prueba en ninguno de los donantes.

REGN5458 mediaba la citotoxicidad de células plasmáticas primarias de macaco cangrejero en ambos donantes de forma dependiente de la concentración; se calculó una CE₅₀ de 1,31 nM para el donante 1, sin embargo, no se pudo determinar una CE₅₀ para el donante 2. En ambos donantes, el tratamiento con REGN5458 produjo un aumento de la citotoxicidad de las células plasmáticas (porcentaje máximo de citotoxicidad del 94 % y del 91 % para los donantes 1 y 2, respectivamente). En paralelo, REGN5458 mediaba la activación de linfocitos T en presencia de células plasmáticas de mono macaco cangrejero de los donantes 1 y 2 de forma dependiente de la concentración con valores de CE₅₀ de 28,1 nM y 18,1 nM para la activación de linfocitos T CD4⁺ y 22,4 nM y 76,7 nM para la activación de linfocitos T CD8⁺, respectivamente. El porcentaje máximo de activación de linfocitos T resultante fue del 9 % y el 16 % para los linfocitos T CD4⁺ y del 12 % y el 17 % para los linfocitos T CD8⁺ en los donantes 1 y 2, respectivamente.

No se observó destrucción de células diana con el control de unión a BCMA a ninguna de las concentraciones probadas en ninguna de las líneas celulares evaluadas. Se observó cierta destrucción de células diana y activación de linfocitos T en presencia de células plasmáticas del donante 2 con el control de unión a CD3 a concentraciones nanomolares.

Tabla 30: Valores de CE₅₀ de citotoxicidad y porcentaje de activación de linfocitos T para cada donante

Líneas celulares		Destrucción citotóxica		Activación de linfocitos T (% de aumento de CD25)			
				Linfocitos T CD4 ⁺		Linfocitos T CD8 ⁺	
Células efectoras	Células diana	CE ₅₀ (M)	% de Citotoxicidad máx	CE ₅₀ (M)	% de Activación	CE ₅₀ (M)	% de Activación
Linfocitos T humanos primarios ^a	Células plasmáticas del donante humano 1	4,28 × 10 ⁻¹¹	91	NR	NR	214 × 10 ⁻¹⁰	2
	Células plasmáticas del donante humano 2	1,91 × 10 ⁻¹⁰	89	NR	NR	8,60 × 10 ⁻¹⁰	36

Líneas celulares		Destrucción citotóxica		Activación de linfocitos T (% de aumento de CD25)			
				Linfocitos T CD4 ⁺		Linfocitos T CD8 ⁺	
Células efectoras	Células diana	CE ₅₀ (M)	% de Citotoxicidad máx	CE ₅₀ (M)	% de Activación	CE ₅₀ (M)	% de Activación
Linfocitos T primarios de mono macaco cangrejero ^a	Células plasmáticas de donante de mono macaco cangrejero 1	1,31 × 10 ⁹	94	2,81 × 10 ⁻⁸	9	224 × 10 ⁻⁸	12
	Células plasmáticas de donante de mono macaco cangrejero 2	ND	91	~1,81 × 10 ⁻⁸	16	7,67 × 10 ⁻⁸	17

^a Se analizaron las células plasmáticas autólogas de cada donante.

Ejemplo 20: Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA × anti-CD3 actúan de forma sinérgica con los anticuerpos anti-PD-1 para potenciar la eficacia antitumoral *in vivo*

- 5 Para determinar si los anticuerpos biespecíficos (Abs) BCMAxCD3 sinergizan con el bloqueo de PD-1 para proporcionar una eficacia antitumoral superior *in vivo*, se realizó un estudio de tumores singénicos en ratones que expresaban CD3 humano. Los resultados demuestran que la combinación de REGN5458 más el bloqueo de PD-1 proporciona una eficacia antitumoral superior a la de REGN5458 o el bloqueo de PD-1 por separado.
- 10 *Implantación y medición de tumores singénicos:* A los ratones C57BL/6 que expresan CD3deg humano en lugar de CD3deg murino (ratones humanizados con CD3) se les implantaron por vía subcutánea 1×10⁶ células de carcinoma de colon MC38 modificadas para expresar BCMA humano de longitud completa (MC38/BCMA). Se dejó que los tumores se establecieran durante 3 días, en cuyo momento se administró a los ratones (n= 6 o 7 por grupo) un Ab biespecífico de control de unión a CD3 (G; H4sH17664D) a una dosis de 0,4 mg/kg o un Ab biespecífico BCMAxCD3 (G; REGN5458) a dosis de 0,04 mg/kg o 0,24 mg/kg, junto con un anticuerpo sustituto anti-ratón PD-1 (Clon RPM1-14) a 4 mg/kg o un Ab de control de isotipo (Clon 2A3) a 4 mg/kg. Los grupos de tratamiento específicos se muestran en la Tabla 31, a continuación.

Tabla 31: Grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento biespecífico	Anticuerpo	n
1	H4SH17664D (0,24 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	7
2	H4SH17664D (0,24 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	7
3	REGN5458 (0,04 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	7
4	REGN5458 (0,04 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	7
5	REGN5458 (0,24 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	6
6	REGN5458 (0,24 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	6

- 20 A los ratones se les administraron estos Abs dos veces más los días 7 y 11 para un total de tres dosis, y se evaluó el crecimiento tumoral a lo largo del experimento.

- 25 *Cálculo del crecimiento y de la inhibición de tumores singénicos:* Con el fin de determinar el volumen tumoral con un calibrador externo, se determinó el mayor diámetro longitudinal (longitud en mm) y el mayor diámetro transversal (anchura en mm). El volumen tumoral basado en las medidas del calibrador se calculó mediante la fórmula: Volumen (mm³) = (longitud × anchura²)/2.

- 30 Los resultados demuestran que la combinación de REGN5458 más el bloqueo de PD-1 proporciona una eficacia antitumoral superior a la de REGN5458 o el bloqueo de PD-1 por separado. En particular, los resultados demuestran que en el día 24 (el último día en el que se recogieron datos para todos los grupos de tratamiento) la combinación del anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 y el anticuerpo anti-PD-1 produjo un efecto terapéutico sinérgico estadísticamente significativo en la inhibición del crecimiento tumoral (Tabla 32, BCMAxCD3 a 0,04 mg/kg y anti-PD-1 a 4 mg/kg).
 35 Utilizando una prueba ANOVA de 2 vías en el día 24, p<0,0001 entre (i) REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo y la combinación de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 3 frente a Grupo 4), (ii) REGN5458 (0,24 mg/kg) + isotipo y la combinación de REGN5458 (0,24 mg/kg) + anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 5 frente a Grupo 6), (iii)

anti-PD-1 y la combinación de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 2 frente a Grupo 6). Utilizando una prueba ANOVA de 2 vías en el día 24, $p=0,0005$ entre anti-PD-1 y la combinación de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 2 frente a Grupo 4). El aumento de la dosis del anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 (0,24 mg/kg) junto con el bloqueo de PD-1 produjo una inhibición tumoral comparable a la dosis más baja del anticuerpo biespecífico más el bloqueo de PD-1 en este experimento. La sinergia demostrada con el anticuerpo biespecífico de dosis más baja es ventajosa porque el uso de una dosis más baja reduce el riesgo de cualquier efecto secundario adverso. De forma similar, la combinación de anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 y anticuerpo anti-PD-1 mostró un efecto terapéutico sinérgico a ambas dosis de anticuerpo biespecífico (0,04 mg/kg y 0,24 mg/kg) en el número de ratones libres de tumor al final del experimento (día 28), como se muestra en la Tabla 33.

Tabla 32: Tamaño promedio del tumor en diferentes puntos temporales

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 3
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	16,30 ± 1,50 n=7
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	14,34 ± 1,17 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	15,62 ± 1,61 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	19,20 ± 2,94 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	13,13 ± 3,12 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	20,41 ± 3,15 n=6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 7
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	55,78 ± 6,61 n=7
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	43,59 ± 8,32 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	37,98 ± 3,93 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	30,30 ± 6,47 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	29,27 ± 5,00 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg)	29,18 ± 3,65
+ RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	n = 6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 11
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	145,74 ± 21,37 n=7
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	45,33 ± 11,46 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	112,53 ± 17,39 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	8,81 ± 0,88 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	36,63 ± 14,89 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	12,99 ± 4,35 n=6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 14
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	414,28 ± 46,72 n=7
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	49,50 ± 17,02 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	438,16 ± 59,56 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	6,86 ± 3,90 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	224,33 ± 47,04 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	22,75 ± 17,62 n=6

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 18
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1035,43 ± 123,41 n=6
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	100,83 ± 41,62 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1040,12 ± 61,95 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	7,81 ± 7,81 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	515,15 ± 115,38 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	57,79 ± 43,62 n=6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 21
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg)	1834,87 ± 639,56
+ Isotipo (4 mg/kg)	n = 2
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	208,29 ± 91,80 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2133,12 ± 129,26 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	21,13 ± 21,13 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1225,47 ± 289,39 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	113,69 ± 85,39 n=6
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 24
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2358,81 ± 0,00 n=1
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	534,03 ± 205,49 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	3648,37 ± 536,71 n=3
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	53,52 ± 53,52 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1493,26 ± 973,01 n=2
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	54,29 ± 54,29 n=5
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 28
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	Todos los animales sacrificados n=0
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	1196,57 ± 467,34 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	Todos los animales sacrificados n=0
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	141,68 ± 141,68 n=7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1371,17 ± 0,00 n=1
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	104,44 ± 104,44 n=5

Tabla 33: Ratones libres de tumores al final del experimento

Tratamiento con anticuerpos	Número de ratones sin tumor al final del experimento (día 28)
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 7
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,24 mg/kg)	2 de 7
+ RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 7

Tratamiento con anticuerpos	Número de ratones sin tumor al final del experimento (día 28)
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	6 de 7
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,24 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	4 de 6

Ejemplo 21: Los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA × anti-CD3 actúan de forma sinérgica con los anticuerpos anti-PD-1 para potenciar la eficacia antitumoral *in vivo*

- 5 Se obtuvieron unos resultados similares en un segundo experimento, idéntico al analizado anteriormente en el Ejemplo 20, excepto que el número de ratones por grupo = 10, y la dosis más alta de BCMAxCD3 REGN5458 fue de 0,4 mg/kg. Los grupos de tratamiento específicos para el segundo experimento se muestran en la Tabla 34, a continuación.

Tabla 34: Grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento biespecífico	Anticuerpo	n
1	H4SH17664D (0,4 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	10
2	H4SH17664D (0,4 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	10
3	REGN5458 (0,04 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	10
4	REGN5458 (0,04 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	10
5	REGN5458 (0,4 mg/kg)	Isotipo (4 mg/kg)	10
6	REGN5458 (0,4 mg/kg)	RPM1-14 (4 mg/kg)	10

- 10 Los resultados demuestran que la combinación de REGN5458 más el bloqueo de PD-1 proporciona una eficacia antitumoral superior a la de REGN5458 o el bloqueo de PD-1 por separado. En particular, los resultados demuestran que en el día 21 (último día en el que se recogieron datos para todos los grupos de tratamiento) la combinación del anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 y el anticuerpo anti-PD-1 produjo un efecto terapéutico sinérgico en la inhibición del crecimiento tumoral (Tabla 35, BCMAxCD3 a 0,04 mg/kg y anti-PD-1 a 4 mg/kg). Utilizando una prueba ANOVA de 2 vías en el día 21, $p < 0,0001$ entre (i) REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo y la combinación de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 3 frente a Grupo 4), (ii) anti-PD-1 y la combinación de REGN5458 (0,04 mg/kg) + anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 2 frente a Grupo 4), (iii) anti-PD-1 y la combinación de REGN5458 (0,4 mg/kg) + anticuerpo anti-PD-1 (Grupo 2 frente a Grupo 6). Como se ha indicado anteriormente en el Ejemplo 20, el aumento de la dosis del anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 (0,4 mg/kg) junto con el bloqueo de PD-1 produjo una inhibición tumoral comparable a la dosis más baja del anticuerpo biespecífico combinado con el bloqueo de PD-1 en este experimento. La sinergia demostrada con el anticuerpo biespecífico de dosis más baja es ventajosa porque el uso de una dosis más baja reduce el riesgo de cualquier efecto secundario adverso. De forma similar, la combinación de anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 y anticuerpo anti-PD-1 mostró un efecto terapéutico sinérgico a ambas dosis de anticuerpo biespecífico (0,04 mg/kg y 0,4 mg/kg) en el número de ratones libres de tumor al final del experimento (día 25), como se muestra en la Tabla 36.

Tabla 35: Tamaño promedio del tumor en diferentes puntos temporales

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 3
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	9,85 ± 0,61 n=10
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	13,44 ± 1,44 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	12,41 ± 2,56 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	9,73 ± 1,25 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	11,22 ± 0,68 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	9,59 ± 1,78 n=10
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm ³) ± SEM el día 6
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	40,43 ± 4,07 n=10

ES 3 010 285 T3

Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 6
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	44,52 ± 2,80 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	38,79 ± 3,52 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	36,42 ± 3,51 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	16,11 ± 1,27 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	24,34 ± 1,86 n=10
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 10
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	149,41 ± 17,08 n=10
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	107,34 ± 13,73 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	116,32 ± 19,99 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	23,48 ± 3,24 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg)	24,27 ± 6,74
+ Isotipo (4 mg/kg)	n = 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	3,60 ± 1,92 n=10
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 13
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	386,55 ± 48,49 n=10
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	186,87 ± 41,06 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	319,91 ± 53,05 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	10,60 ± 2,34 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	50,93 ± 20,00 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	0,74 ± 0,74 n=10
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 18
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1809,29 ± 242,64 n=9
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	688,52 ± 152,20 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	1314,27 ± 211,22 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	6,28 ± 4,55 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	248,51 ± 107,21 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	3,93 ± 2,67 n=10
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm3) ± SEM el día 21
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	3094,87 ± 482,38 n=8
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	1425,22 ± 338,49 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2446,35 ± 395,48 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	15,03 ± 10,35 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	453,43 ± 174,75 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	9,34 ± 7,59 n=10

ES 3 010 285 T3

mg/kg)	
Tratamiento con anticuerpos	Tamaño promedio del tumor (mm³) ± SEM el día 25
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	Animales sacrificados n=0
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	1918,27 ± 571,19 n=6
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2411,64 ± 451,96 n=3
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	38,96 ± 21,47 n=10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	661,70 ± 331,60 n=8
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	32,02 ± 24,67 n=10

Tabla 36: Ratones libres de tumores al final del experimento

Tratamiento con anticuerpos	Número de ratones sin tumor al final del experimento (día 25)
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 10
Control de unión a CD3 H4SH17664D (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	1 de 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	0 de 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,04 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	7 de 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + Isotipo (4 mg/kg)	2 de 10
BCMAxCD3 REGN5458 (0,4 mg/kg) + RPM1-14 de bloqueo de PD-1 (4 mg/kg)	8 de 10

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, que comprende:
 - 5 (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) humano que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 68, 70, 72, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88; y
 - 10 (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 92, 94, 96, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88.
- 15 2. Una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, que comprende:
 - (a) un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) humano que comprende los dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 68, 70, 72, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88; y
 - 20 (b) un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende dominios HCDR1, HCDR2, HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 100, 102, 104, y los dominios LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 84, 86, 88.
- 25 3. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de la reivindicación 1, en donde:
 - (a) el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; y
 - 30 (b) el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.
4. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de la reivindicación 2, en donde:
 - (a) el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; y
 - 35 (b) el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.
- 40 5. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es un anticuerpo biespecífico.
6. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de la reivindicación 5, en donde:
 - (a) el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de cadena pesada de IgG humana de isotipo IgG1 o IgG4; y/o
 - 45 (b) el anticuerpo biespecífico comprende una bisagra quimérica que reduce la unión al receptor Fc γ en relación con una bisagra de tipo silvestre del mismo isotipo.
- 50 7. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
8. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 55 9. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
- 60 11. Una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso en un método de inhibición del crecimiento de un tumor de células plasmáticas en un sujeto.
- 65 12. Una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso en un método de tratamiento de mieloma múltiple, u otra neoplasia maligna de linfocitos B que expresa BCMA.

- 5 13. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la neoplasia maligna de linfocitos B que expresa BCMA se selecciona del grupo que consiste en macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmocítico y linfoma de Hodgkin.
- 10 14. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, 12 o la reivindicación 13, en donde la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, o la composición farmacéutica, debe administrarse junto con un segundo agente terapéutico o terapia.
- 15 15. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el segundo agente terapéutico o terapia comprende un fármaco quimioterapéutico, alquilantes de ADN, inmunomoduladores, inhibidores del proteasoma, inhibidores de histona desacetilasa, radioterapia, un trasplante de células madre, un anticuerpo biespecífico diferente que interactúa con un antígeno de superficie de células tumorales diferente y un antígeno de linfocitos T o células inmunitarias, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico conjugado con un agente antitumoral, un inhibidor del punto de control PD-1, PD-L1, o CTLA-4, o combinaciones de los mismos.
- 20 16. Una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso en un método de tratamiento de un tumor que expresa BCMA, en donde la molécula de unión a antígeno biespecífica aislada, o la composición farmacéutica, debe administrarse al sujeto junto con un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 25 17. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo anti-PD-1.
18. La molécula de unión a antígeno biespecífica aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el anticuerpo anti-PD-1 es cemiplimab (REGN2810).

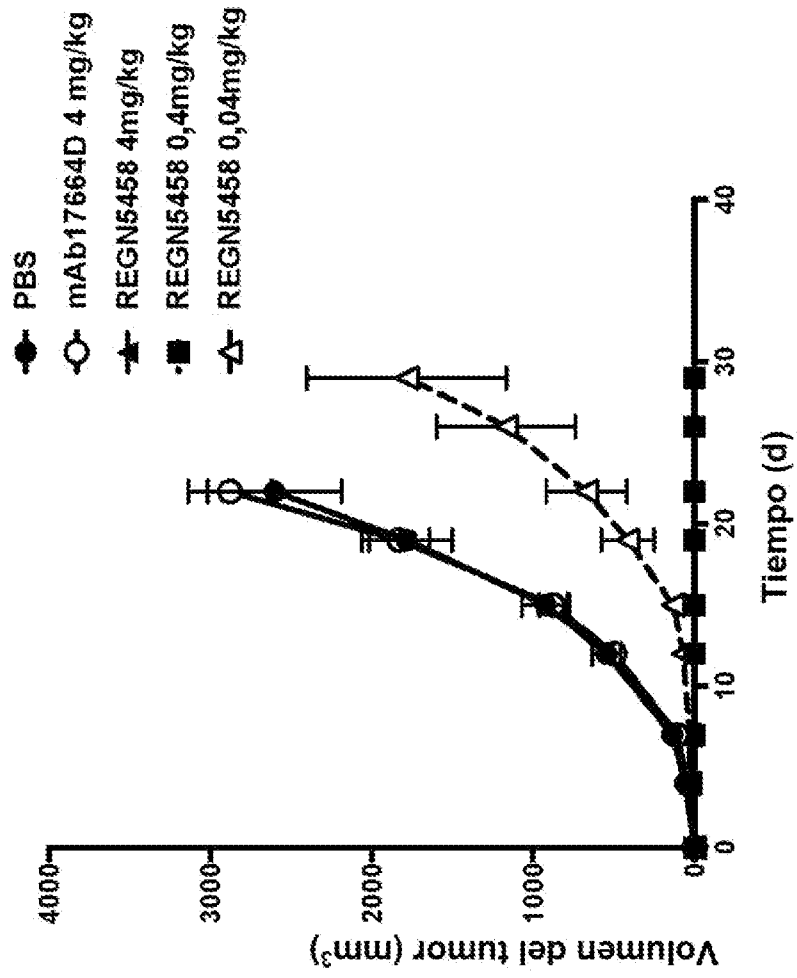


Figura 1

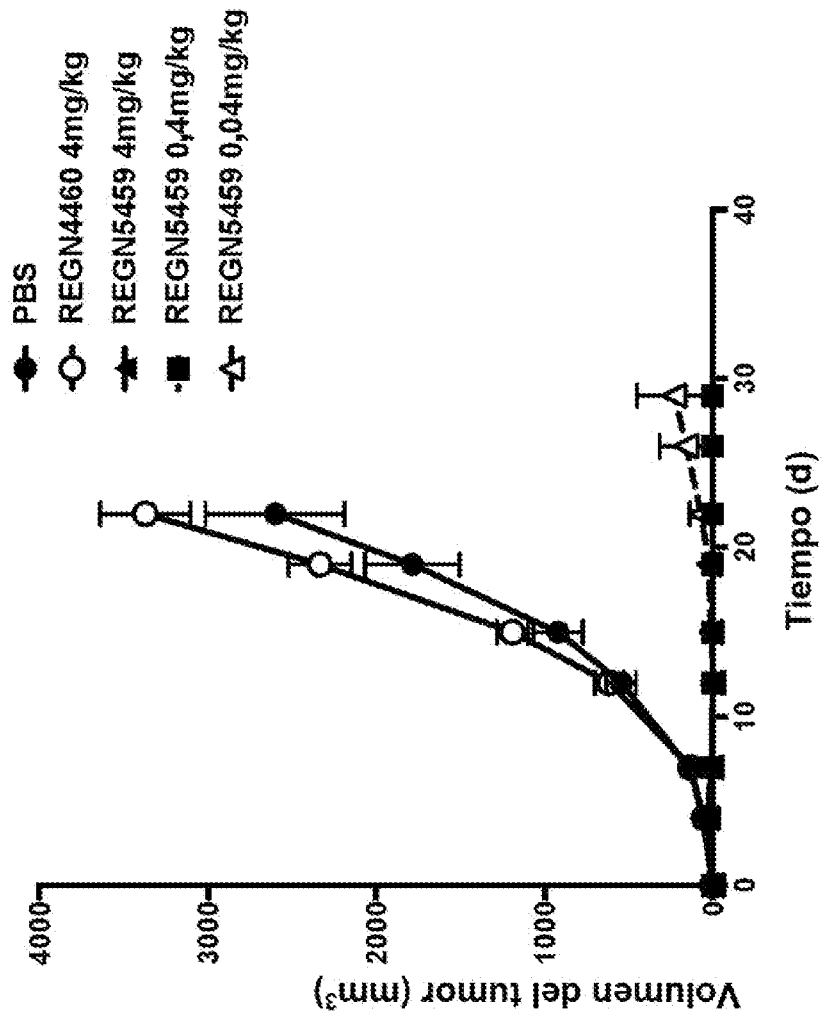


Figura 2

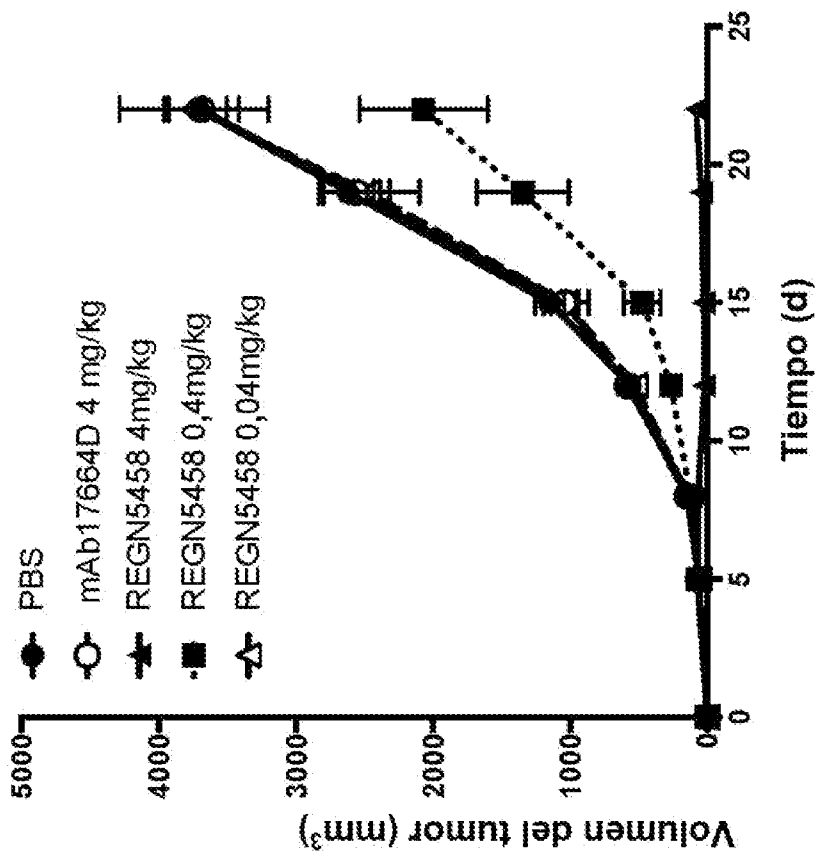


Figura 3

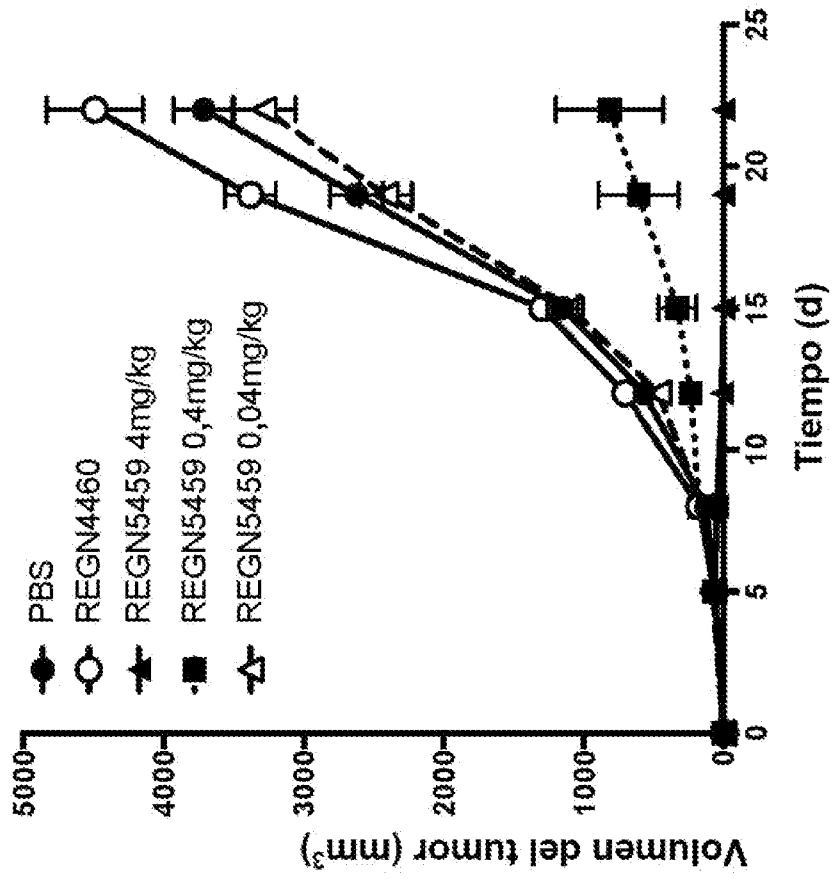


Figura 4

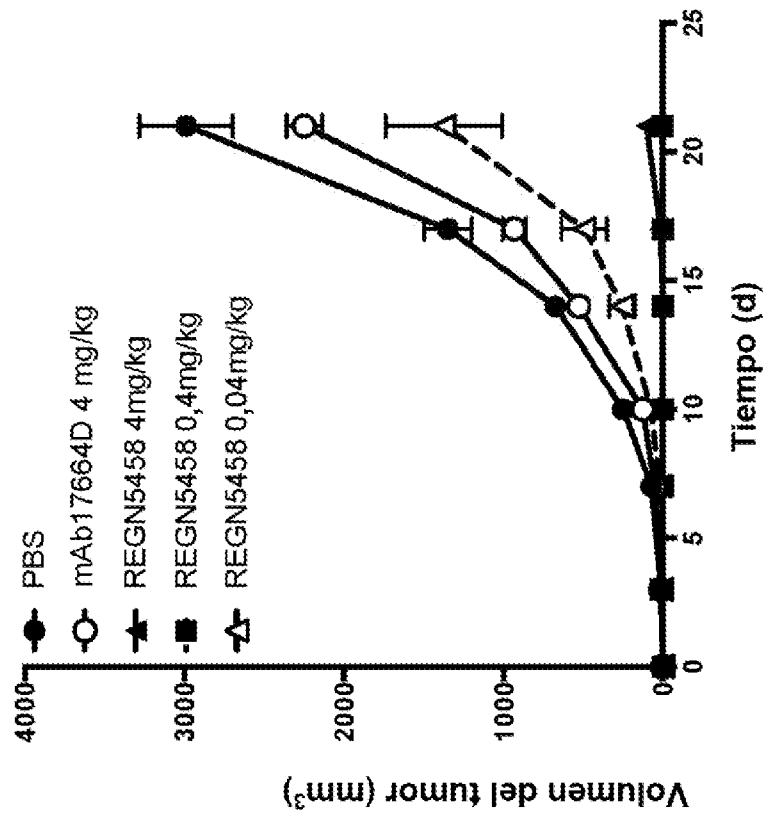


Figura 5

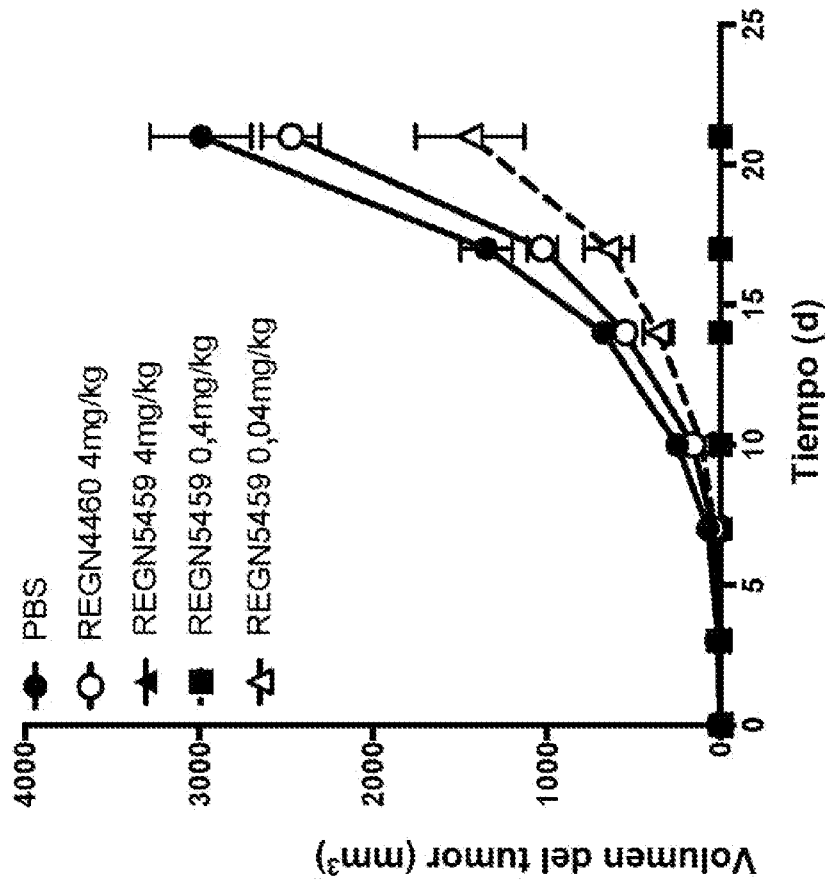


Figura 6

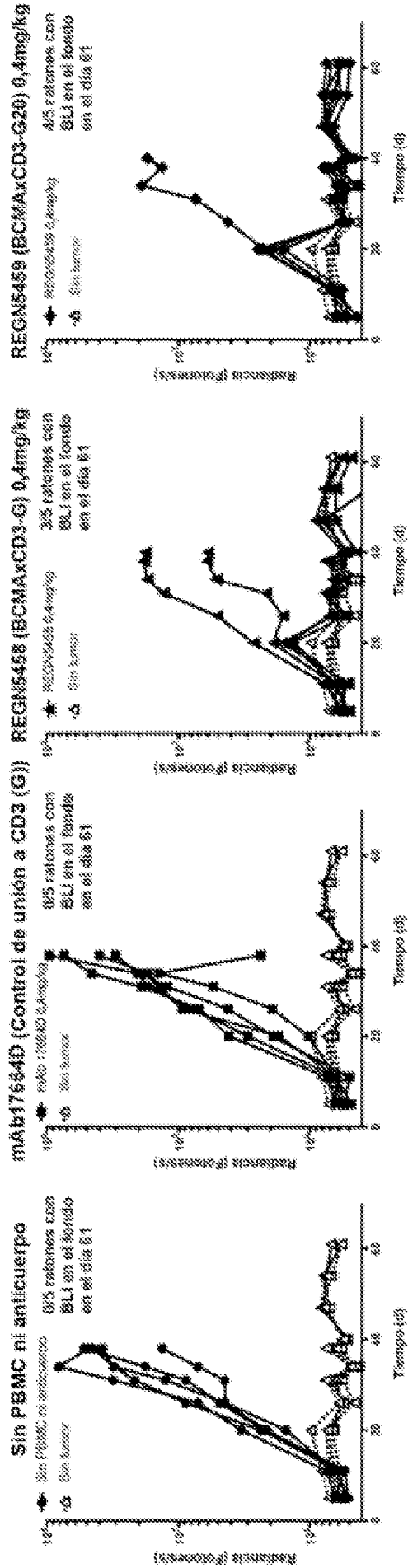


Figura 7