



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 023 158**

⑮ Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2018** PCT/US2018/044778

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** WO19028125

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2018** E 18840836 (3)

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2025** EP 3661555

⑤ Título: **Anticuerpos biespecíficos y sus usos**

⑩ Prioridad:

01.08.2017 US 201762539970 P
06.04.2018 US 201862654112 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.05.2025

⑬ Titular/es:

AB THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
3541 Investment Blvd. Suite 3
Hayward, CA 94545, US

⑭ Inventor/es:

LIU, YUE;
CAI, WENYAN y
SHI, JIADONG

⑯ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 023 158 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 y sus usos

5 **RECLAMACIÓN DE PRIORIDAD**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense número de serie 62/539,970, presentada el 1 de agosto de 2017 y la solicitud provisional estadounidense número de serie 62/654,112, presentada el 6 de abril de 2018.

10

CAMPO TÉCNICO

Esta divulgación se refiere a anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

15 **ANTECEDENTES**

Un anticuerpo biespecífico es una proteína artificial que puede unirse simultáneamente a dos tipos diferentes de antígenos o a dos epítopos distintos. Esta doble especificidad abre un amplio abanico de aplicaciones, como la redirección de linfocitos T a células tumorales, el bloqueo simultáneo de dos vías de señalización diferentes, la doble diana de diferentes mediadores patológicos y la administración de cargas útiles a sitios específicos. La aprobación del catumaxomab (anti-EpCAM y anti-CD3) y del blinatumomab (anti-CD19 y anti-CD3) ha supuesto un hito importante en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos.

20

El documento WO 2017/010874 A1 describe anticuerpos que se unen a CD3 humano. El documento WO 2016/086189 A2 describe anticuerpos heterodímeros que se unen a CD3 y antígenos tumorales. El documento WO 2015/143079 A1 describe anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 y antígenos tumorales. El documento WO 2014/189973 A2 describe anticuerpos antirreceptor de transferrina. Wenyan C. *et al.* describen en *Antibody Therapeutics*, vol. 4, n.º 4, 8 de octubre de 2021, páginas 228-241, la validación de la actividad biológica de un activador de células T Rituximab/CD3 diseñado computacionalmente, dirigido a cánceres CD20⁺ con múltiples mecanismos de acción.

30

Como los anticuerpos biespecíficos tienen diversas aplicaciones, es necesario seguir desarrollando diversas terapias basadas en anticuerpos biespecíficos.

RESUMEN

35

La presente invención se define mediante la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan formas de realización adicionales de la invención.

40

Esta divulgación se refiere a anticuerpos biespecíficos desequilibrados o fragmentos de unión a antígenos, en donde los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígenos se unen específicamente a dos antígenos diferentes con diferentes afinidades de unión.

45

De acuerdo con la invención reivindicada, esta divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1), una segunda región variable de cadena pesada (VH2), una primera región variable de cadena ligera (VL1) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2), en donde la VH1 y la VL1 se asocian entre sí, formando una primera región de unión a antígeno que se une específicamente a CD20, y la VH2 y la VL2 se asocian entre sí, formando una segunda región de unión a antígeno que se une específicamente a CD3, en donde la VL1 y la VL2 son idénticas, y en donde la VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 1; la VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 2; la VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 3; y la VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 3.

50

En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende el VH1, una segunda cadena pesada que comprende el VH2, una primera cadena ligera que comprende el VL1 y una segunda cadena ligera que comprende el VL2, en donde la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se asocian entre sí mediante el método de perillas en agujeros.

55

En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico tiene una región Fc funcional que puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

60

En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un primer polipéptido, un segundo polipéptido, un tercer polipéptido y un cuarto polipéptido, en donde el primer polipéptido es una cadena pesada que comprende el VH1, donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 34, 35 o 36; el segundo polipéptido es una cadena pesada que comprende el VH2, donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 37, 38 o 39; el tercer polipéptido es una cadena ligera que comprende la VL1, donde el

tercer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 40; y el cuarto polipéptido es una cadena ligera que comprende la VL2, donde el cuarto polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 40, donde el primer polipéptido y el tercer polipéptido se asocia entre sí y se une específicamente a CD20, y donde el segundo polipéptido y el cuarto polipéptido se asocian entre sí y se unen específicamente a CD3.

5 De acuerdo con la invención reivindicada, esta divulgación proporciona además una célula que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente.

10 De acuerdo con la invención reivindicada, esta divulgación proporciona además una composición que comprende el anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión a antígeno descrito anteriormente para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto.

15 En algunas formas de realización, el sujeto tiene un tumor sólido, melanoma, carcinoma pancreático, una neoplasia maligna hematológica, linfoma no Hodgkin, linfoma o leucemia linfocítica crónica.

20 Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Se describen aquí métodos y materiales para su uso en la presente invención; también pueden utilizarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no limitativos. En caso de conflicto entre la presente memoria descriptiva y una referencia mencionada en este documento, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones.

25 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 **FIG. 1A** es un gráfico que muestra que el anticuerpo A rediseñado en el Ejemplo 1 se une a las células Raji, que expresan CD20.

FIG. 1B es un gráfico que muestra que el anticuerpo rediseñado B en Ejemplo 1 se une a las células Jukart, que expresan CD3.

FIG. 2A. Resultados del ensayo de unión de células CD20+ Raji.

35 **FIG. 2B.** Resultados del ensayo de unión de células Jurkat CD3+.

FIG. 3. Ensayo de activación de células T (CD20/3 en la figura es el BsMab CD20/CD3; A10 y A11 indican diferentes fracciones de elución; el isótipo es un anticuerpo IgG1, que se utilizó como control).

FIG. 4. Curva de titulación de la activación de células T para diferentes anticuerpos.

40 **FIG. 5.** Muerte de células Raji CD20+ mediada por anticuerpos en presencia de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

FIG. 6. Muerte de células Raji CD20+ mediada por anticuerpos en presencia de PBMC en las que las células T fueron activadas por IL-2 y perlas CD3/CD28 durante 4 días.

FIG. 7. Muerte de células Raji CD20+ mediada por anticuerpos en presencia de PBMC en las que las células T fueron activadas por IL-2 y perlas CD3/CD28 durante 7 días.

45 **FIG. 8.** Muerte de células Jurkat CD3+ mediada por anticuerpos en presencia de PBMC.

FIG. 9. Muerte de células Jurkat CD3+ mediada por anticuerpos en presencia de PBMC en las que las células T fueron activadas por IL-2 y perlas CD3/CD28 durante 4 días.

FIG. 10. Muerte de células Jurkat CD3+ mediada por anticuerpos en presencia de PBMC en las que las células T fueron activadas por IL-2 y perlas CD3/CD28 durante 7 días.

50 **FIG. 11.** Agotamiento de células T activadas en PBMC inducido por anticuerpos.

FIG. 12. Agotamiento de células T inactivadas en PBMC inducido por anticuerpos.

FIG. 13. Lisis de células Raji mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) determinada por FACS.

FIG. 14. Lisis de células Raji mediada por CDC determinada por la liberación de calceína.

55 **FIG. 15.** Lisis de células Jurkat mediada por CDC según lo determinado por FACS (A11 y B3 son fracciones de elución diferentes).

FIG. 16. Agotamiento de células T en PBMC en presencia de suero enriquecido con complemento humano.

FIGS. 17-19. Lisis celular resistente a rituximab mediada por activación de células T basada en PBMC de 3 donantes diferentes.

FIG. 20. Activación de células T para evaluar anticuerpos purificados.

60 **FIG. 21A.** Peso promedio de los ratones de cada grupo tras la inyección de solución salina tamponada con fosfato (PBS, GI), BsMab CD20/CD3 (G2; "BIS") o Rituximab (G3; "RTX").

FIG. 21B. Intensidad media de imagen de las células Raji marcadas con luciferasa en cada grupo tras la inyección de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (GI), BsMab CD20/CD3 (G2; "BIS") o Rituximab (G3; "RTX").

65 **FIG. 22A.** Resultados de la electroforesis capilar reductora con dodecil sulfato de sodio (Re-CE-SDS) para muestras de anticuerpos biespecíficos CD20/CD3 purificados.

- FIG. 22B.** Resultados de CE no reductor (Non-Re-CE-SDS) para muestras de anticuerpos biespecíficos CD20/CD3 purificados.
- FIG. 23A.** Afinidades de unión para Avelumab (PD-L1 wt) y los anticuerpos IgG monodímeros PD-L1 diseñados (PD-L1 VI) que comprenden VHa para PD-L1 (SEQ ID NO: 4) y VL común (SEQ ID NO: 6).
- FIG. 23B.** Afinidades de unión para el anticuerpo anti-CD55 parental (CD55 wt) y los anticuerpos IgG monodímeros CD55 diseñados (CD55 VI) que comprenden VHb para CD55 (SEQ ID NO: 5) y VL común (SEQ ID NO: 6).
- FIG. 24.** Alineación de la cadena ligera común para BsMab v1 (SEQ IN NO: 67) y la cadena ligera común para BsMab v2 (SEQ ID NO: 68).
- FIG. 25A.** Afinidades de unión para Avelumab (PD-L1 wt) y los anticuerpos IgG monodímeros PD-L1 rediseñados (PD-L1 V2) que comprenden VHa para PD-L1 (SEQ ID NO: 4) y Common VL v2 (SEQ ID NO: 7).
- FIG. 25B.** Afinidades de unión para el anticuerpo anti-CD55 parental (CD55 wt) y los anticuerpos IgG monodímero CD55 rediseñados (CD55 V2) que comprenden VHb para CD55 (SEQ ID NO: 5) y VL v2 común (SEQ ID NO: 7).
- FIGS. 26A-26B.** CDC mediada por anticuerpos en células MDA231.
- FIG. 27A.** Resultados del ensayo de internalización de anticuerpos con células MDA231.
- FIG. 27B.** Resultados del ensayo de internalización de anticuerpos con células SIHA.
- FIG. 28** es un diagrama esquemático que muestra cómo un anticuerpo biespecífico que se une a CD3 y a un antígeno del cáncer (por ejemplo, antígeno específico del cáncer) puede reconocer y matar una célula tumoral.
- FIG. 29** es un diagrama esquemático que muestra cómo un anticuerpo biespecífico que se une a un antígeno específico del cáncer y a un antígeno asociado al cáncer puede reconocer y matar una célula tumoral.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Un anticuerpo biespecífico o un fragmento del mismo que se une al antígeno es una proteína artificial que puede unirse simultáneamente a dos tipos diferentes de antígenos. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener dos brazos (brazos A y B). Cada brazo tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera.

El anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión al antígeno puede ser similar a IgG y no similar a IgG. El anticuerpo biespecífico tipo IgG puede tener dos brazos Fab y una región Fc, y los dos brazos Fab se unen a diferentes antígenos. El anticuerpo biespecífico no similar a IgG o el fragmento de unión al antígeno pueden ser, por ejemplo, Fabs unidos químicamente (por ejemplo, dos regiones Fab están unidas químicamente) y fragmentos variables de cadena simple (scFV). Por ejemplo, un scFV puede tener dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera.

35 En un anticuerpo biespecífico desequilibrado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, los dos brazos (Brazos: A y B) o las dos regiones de unión a antígeno (Regiones de unión a antígeno: A y B) pueden unirse a los respectivos antígenos objetivo con diferentes afinidades. Las afinidades de unión se pueden expresar mediante la constante de asociación (Ka):

$$Ka = [\text{Anticuerpo-Antígeno}] / [\text{Anticuerpo}] [\text{Antígeno}]$$

40 Los anticuerpos con alta afinidad suelen tener $Ka > 10^7 \text{ M}^{-1}$. La Ka de un brazo o una región de unión a antígeno puede ser mayor que 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o 10^{12} M^{-1} . En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la Ka puede ser menor que 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o 10^{12} M^{-1} .

45 La afinidad de unión del primer brazo o de la primera región de unión a antígeno (A) puede ser mayor que la afinidad de unión del segundo brazo o de la segunda región de unión a antígeno (B). Los anticuerpos biespecíficos con afinidades desequilibradas pueden tener varias ventajas. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos con afinidades desequilibradas para atacar un antígeno específico del cáncer en las células cancerosas y el CD3 en las células T. En este caso, la alta afinidad al antígeno específico del cáncer puede conducir a una mejor captura de las células cancerosas por las células T, y la baja afinidad a CD3 puede evitar el desencadenamiento de la señalización de las células T por CD3 (FIG. 28). Sólo cuando el anticuerpo biespecífico es presentado a la célula T de manera multivalente por una célula cancerosa objetivo, la célula T puede activarse y matar a la célula cancerosa objetivo. Además, los anticuerpos biespecíficos con afinidades desequilibradas también se pueden utilizar para atacar un antígeno específico del cáncer y un antígeno asociado al cáncer (FIG. 29). En este caso, el anticuerpo biespecífico sólo se une débilmente a las células no cancerosas que expresan un nivel bajo de antígenos asociados al cáncer, pero se une fuertemente a las células cancerosas que expresan tanto antígenos específicos del cáncer como un nivel alto de antígenos asociados al cáncer.

55 Para un anticuerpo biespecífico con afinidades desequilibradas, la Ka para el primer brazo o la primera región de unión al antígeno (A) puede ser mayor que 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} o 10^{12} M^{-1} . En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la Ka para el primer brazo o la primera región de unión al antígeno (A) puede ser 10, 100, 1000, 10000 o 100000 veces mayor que la Ka para el segundo brazo o la segunda región de unión al antígeno (B). Por tanto, en algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la Ka para el segundo brazo o la segunda región de unión al antígeno (B) puede ser menor que 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} o 10^9 M^{-1} . En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la Ka del segundo brazo o la segunda región de unión al antígeno (B) todavía se une específicamente al antígeno objetivo con una afinidad razonable, por ejemplo, mayor que 10^4 M^{-1} , 10^5 M^{-1} o 10^6 M^{-1} . La afinidad de unión también se puede expresar mediante la constante de disociación (Kd).

$$K_d = [\text{Anticuerpo}] [\text{Antígeno}] / [\text{Anticuerpo-Antígeno}]$$

La K_d puede ser menor que 10^{-5} M , 10^{-6} M , 10^{-7} M , 10^{-8} M , 10^{-9} M , 10^{-10} M , 10^{-11} M o 10^{-12} M . En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la K_d puede ser mayor que 10^{-5} M , 10^{-6} M , 10^{-7} M , 10^{-8} M , 10^{-9} M , 10^{-10} M , 10^{-11} M o 10^{-12} M .

5 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la afinidad de unión del primer brazo o de la primera región de unión al antígeno (A) es mayor que la afinidad de unión del segundo brazo o de la segunda región de unión al antígeno (B). Por ejemplo, la K_d para el segundo brazo o la segunda región de unión al antígeno (B) puede ser 10, 100, 1000, 10000 o 100000 veces mayor (por lo tanto, con menor afinidad) que la K_d para el primer brazo o la primera región de unión al antígeno (A). Así, en algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la K_d para el primer brazo o la primera región de unión a antígeno (A) puede ser menor que 10^{-7} M , 10^{-8} M , 10^{-9} M , 10^{-10} M , 10^{-11} M o 10^{-12} M ; y la K_d para el segundo brazo o la segunda región de unión a antígeno (B) puede ser mayor que 10^{-5} M , 10^{-6} M , 10^{-7} M , 10^{-8} M o 10^{-9} M .

10

15 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión a antígeno comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada una de las dos cadenas ligeras tiene una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Cada una de las dos cadenas pesadas tiene una región variable de cadena pesada (VH) y tres regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, las dos cadenas ligeras del brazo A y del brazo B son las mismas. Por tanto, los CDR en la VL de dos cadenas ligeras pueden ser los mismos. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, las dos cadenas pesadas del anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión al antígeno son diferentes. Por tanto, los CDR en el VH de dos cadenas pesadas son diferentes.

20

25 Se pueden utilizar varios métodos para garantizar que las mismas cadenas pesadas no se asocien entre sí al producir anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, el método de "perillas en agujeros" introduce una mutación para un aminoácido con una cadena lateral grande en una cadena pesada y una mutación para un aminoácido con una cadena lateral pequeña en la otra cadena pesada. Por lo tanto, las mismas cadenas pesadas tienen menos probabilidades de asociarse entre sí y las dos cadenas pesadas diferentes tienen una mayor probabilidad de asociarse entre sí. Los enfoques de "perillas en agujeros" se describen, por ejemplo, en Ridgway, John BB, Leonard G. Presta y Paul Carter. "Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization". *Protein Engineering, Design and Selection* 9.7 (1996).

30

Anticuerpos biespecíficos desequilibrados que se unen al antígeno específico de las células T y a los antígenos del cáncer

35 Los anticuerpos biespecíficos (BsAb o BsMab) con un brazo de unión a un antígeno específico de las células T (por ejemplo, CD3, CD4 o CD8) que puede reclutar y activar las células T se han estudiado ampliamente para la terapia del cáncer. Sin embargo, la función efectora de muchos de estos anticuerpos biespecíficos se elimina debido a preocupaciones de seguridad. Debido a que se ha demostrado que la función efectora de un anticuerpo como ADCC y CDC desempeña un papel fundamental en la eliminación de células cancerosas, mantener de forma "segura" la función efectora de un anticuerpo ampliaría los mecanismos de acción de un anticuerpo terapéutico y mejoraría la función del anticuerpo para eliminar el cáncer. Para mantener de forma "segura" las funciones efectoras y ampliar las aplicaciones de estos anticuerpos biespecíficos, se ha desarrollado una plataforma tecnológica de anticuerpos biespecíficos desequilibrados basada en el diseño computacional de anticuerpos.

40

45 En este diseño, la primera región de unión al antígeno se dirige a un antígeno específico del cáncer, y la segunda región de unión al antígeno se dirige a un antígeno específico de células T (por ejemplo, CD3, CD4 o CD8) para reclutar células T para atacar el cáncer con el antígeno específico del cáncer (FIG. 28).

50 Tal como se utiliza en este documento, el término "antígeno específico del cáncer" se refiere a antígenos que se expresan específicamente en las superficies de las células cancerosas. Estos antígenos se pueden utilizar para identificar células tumorales. Las células normales rara vez expresan antígenos específicos del cáncer. Algunos antígenos específicos del cáncer a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, CD20, PSA, PSCA, PD-L1, Her2, Her3, Her1, β -Catenina, CD19, CEACAM3, EGFR, c-Met, EPCAM, PSMA, CD40, MUC1 e IGFIR, etc. El PSA se expresa principalmente en las células del cáncer de próstata y el Her2 se expresa principalmente en las células del cáncer de mama.

55

En esta divulgación se proporciona un anticuerpo biespecífico que se une a CD20 y CD3. Este anticuerpo biespecífico se puede aplicar para atacar múltiples cánceres CD20 positivos, como el linfoma no Hodgkin (LNH) CD20 positivo, por lo que se puede utilizar para tratar el linfoma no Hodgkin en un sujeto. Debido a que el anticuerpo biespecífico aplica un mecanismo de acción diferente para tratar el cáncer en comparación con los anticuerpos terapéuticos dirigidos solo al CD20, se puede aplicar como una terapia complementaria para los cánceres CD20 positivos, especialmente para aquellos cánceres CD20 positivos que no responden bien a las terapias CD20 actuales (como el LNH resistente al rituximab).

60

65 Un anticuerpo con alta afinidad por CD3 puede desencadenar la señalización de las células T y causar una respuesta inmune indeseable. Por lo tanto, se requiere una afinidad baja (por ejemplo, K_d puede ser menor que 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} o 10^7 M^{-1} por CD3) para reducir el riesgo de desencadenar la señalización de células T por CD3 mientras se mantiene "de manera segura" la función efectora del anticuerpo. Tal como se utiliza en este documento, el término "mantener de forma

- segura la función efectora del anticuerpo" significa que el anticuerpo no induce ADCC o CDC en células normales (por ejemplo, células no cancerosas). Cuando se presentan múltiples anticuerpos biespecíficos en una célula cancerosa objetivo (por ejemplo, en un grupo) y unen la interacción entre la célula cancerosa y la célula T, estos anticuerpos biespecíficos pueden desencadenar la señalización de las células T a través de CD3 de manera multivalente, y las células T activadas matarán entonces las células cancerosas objetivo.
- Por lo tanto, la divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 2, y la primera y la segunda región variable de cadena ligera comprenden una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 3.
- En algunas formas de realización, las secuencias CDR para la unión a CD20 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, SEQ ID NOs: 16-18, y CDR del dominio variable de cadena ligera, SEQ ID NOs: 28-30, como se define mediante la numeración de Kabat. Según la numeración de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de la cadena pesada se establecen en las SEQ ID NOs: 19-21, y las CDR del dominio variable de la cadena ligera se establecen en las SEQ ID NOs: 31-33.
- En algunas formas de realización, las secuencias CDR para la unión a CD3 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, SEQ ID NOs: 22-24, y CDR del dominio variable de cadena ligera, SEQ ID NOs: 28-30, según se define mediante la numeración de Kabat. Según la numeración de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de la cadena pesada se establecen en las SEQ ID NOs: 25-27, y las CDR del dominio variable de la cadena ligera se establecen en las SEQ ID NOs: 31-33.
- En algunas formas de realización, el anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión a antígeno comprende una primera secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 34, 35 o 36; una segunda secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 37, 38 o 39; una primera secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 40; y una segunda secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 40. En algunas formas de realización, la primera secuencia de aminoácidos de cadena ligera y la segunda secuencia de aminoácidos de cadena ligera son idénticas.
- Anticuerpos biespecíficos desequilibrados que se unen a antígenos específicos del cáncer y a antígenos asociados al cáncer.**
- La presente divulgación también proporciona anticuerpos biespecíficos desequilibrados que tienen la primera región de unión al antígeno dirigida a un antígeno específico del cáncer, y la segunda región de unión al antígeno dirigida a un antígeno asociado al cáncer.
- Tal como se utiliza en este documento, el término "antígeno asociado al cáncer" se refiere a antígenos que se expresan a un nivel relativamente alto en las células cancerosas pero que también pueden expresarse a un nivel relativamente bajo en las células normales. CD55, CD59, CD46 y muchas moléculas de adhesión como N-cadherina, VE-cadherina, NCAM, Mel-CAM, ICAM, NrCAM, VCAMI, ALCAM, MCAM, etc., son antígenos asociados al cáncer. Si bien tanto el antígeno específico del cáncer como el antígeno asociado al cáncer se expresan en la superficie de las células cancerosas, la diferencia entre un antígeno específico del cáncer y un antígeno asociado al cáncer es que el antígeno asociado al cáncer también se expresa en las células normales, pero a un nivel relativamente bajo en comparación con el nivel en las células cancerosas. Por el contrario, un antígeno específico del cáncer rara vez se expresa en células normales, e incluso si se expresa en células normales, la cantidad es extremadamente baja. Un anticuerpo que se dirige al antígeno específico del cáncer generalmente no inducirá citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) ni citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en células normales. Por el contrario, un anticuerpo que se dirige a un antígeno asociado al cáncer con alta afinidad puede causar efectos citotóxicos entre las células normales. Por lo tanto, es importante que el anticuerpo biespecífico se una a un antígeno asociado al cáncer con una afinidad relativamente baja (FIG. 29).
- En los ejemplos se proporciona un anticuerpo biespecífico que se une a PD-L1 y CD55. Este anticuerpo se puede utilizar para tratar a un sujeto con cánceres PD-L1 y CD55 positivos a través de ADCC o CDC, así como para bloquear la interacción PD-L1/PDI para activar la respuesta inmune dependiente de células T y disminuir la represión de CD55 en CDC. Además, como las células cancerosas pueden volverse resistentes a los anticuerpos PD-L1, la unión entre el segundo brazo y el CD55 en las células cancerosas puede proporcionar efectos terapéuticos adicionales.
- Por lo tanto, la divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera, en donde la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %,

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 4, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 5, y la primera y la segunda región variable de cadena ligera comprenden una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 6 o 7.

5 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, las secuencias CDR para la unión a PD-L1 incluyen CDR del dominio variable de la cadena pesada, SEQ ID NOs: 41-43, y CDR del dominio variable de la cadena ligera, SEQ ID NOs: 53-55 o 59-61, tal como se define mediante la numeración de Kabat. Según la numeración de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de la cadena pesada se establecen en las SEQ ID NOs: 44-46, y las CDR del dominio variable de la cadena ligera se establecen en las SEQ ID NOs: 56-58 o 62-64.

10 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, las secuencias CDR para la unión a CD55 incluyen CDR del dominio variable de la cadena pesada, SEQ ID NOs: 47-49, y CDR del dominio variable de la cadena ligera, SEQ ID NOs: 53-55 o 59-61, tal como se define mediante la numeración de Kabat. Según la numeración de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de la cadena pesada se establecen en las SEQ ID NOs: 50-52, y las CDR del dominio variable de la cadena ligera se establecen en las SEQ ID NOs: 56-58 o 62-64.

15 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión a antígeno comprende una primera secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 65; una segunda secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 66; una primera secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 67 o 68; y una segunda secuencia de aminoácidos de cadena ligera que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 67 o 68. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la secuencia de aminoácidos de la primera cadena ligera y la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena ligera son idénticas.

Fabricación de un anticuerpo biespecífico desequilibrado o un antígeno o un fragmento de unión al antígeno del mismo

30 El anticuerpo biespecífico o un antígeno o un fragmento de unión al antígeno del mismo se puede fabricar mediante los métodos siguientes:

35 1) Seleccionar dos antígenos diana y determinar la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VHa) y la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VLa) de un anticuerpo (Anticuerpo A) que se une al primer antígeno, y determinar la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VHb) y la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VLb) de un anticuerpo (Anticuerpo B) que se une al segundo antígeno.

40 2) Alinear VLa y VLb, si la homología de secuencia es superior al 80 %, diseñar un VL común utilizando herramientas de modelado informático (como BioLuminate de Schordingerm, Cambridge, MA). Durante el proceso de diseño, intente mantener la afinidad de VLa, pero puede sacrificar la afinidad de VLb hasta cierto punto. El VL común puede ser VLa, VLb en sí o un nuevo VLC cuya secuencia comparte una alta homología con VLa y VLb. La estructura 3D de VLa y VLb se puede determinar, por ejemplo, a partir del modelado de la estructura o de la estructura cristalina. El proceso puede comenzar con la secuencia de VLa. Si, basándose en la estructura 3D, se identifica que un aminoácido en la cadena ligera es importante para la unión al segundo antígeno (por ejemplo, cuando está emparejado con VHb) y no está involucrado en la unión con el primer antígeno (por ejemplo, cuando está emparejado con VHa), entonces el aminoácido en VLa se puede cambiar al aminoácido correspondiente en VLb. Después de repetir este proceso varias veces, se puede obtener un VLC común.

50 3) Si la homología de VLa y VLb es menor a 80 %, cree una biblioteca de fagos ScFV o Fab humanos reemplazando las VL de una biblioteca ScFV humana vírgenes existente con la VL del Anticuerpo A, luego use PCR propensa a errores para inducir menos del 20 % de las mutaciones del título de ácido nucleico en la VL, haciendo una selección contra el antígeno del Anticuerpo B para obtener un nuevo Anticuerpo B' con VLa o su homólogo (con >80 % de homología) como su VL. Si el VL no es VLa, sino un homólogo de VLa (por ejemplo, con >80 % de homología), se repite el paso 2) para diseñar un VL común.

55 4) Utilizar herramientas de modelado informático para rediseñar la secuencia de VHa y VHb respectivamente con el fin de aumentar la diferencia de las características bioquímicas y biofísicas de A y B (como el punto isoelectrónico 3D (PI)). Durante este proceso, la afinidad de A no se puede reducir y la afinidad de B se puede reducir hasta cierto punto.

60 5) Desarrollar un sistema de tampón para purificar el anticuerpo biespecífico desequilibrado.

65 El punto isoelectrónico (PI) de un péptido es el pH en el que una molécula particular no tiene carga eléctrica neta en la media estadística. Los aminoácidos que componen un péptido pueden ser de naturaleza positiva, negativa, neutra o polar y juntos le dan a la proteína su carga general. Sin embargo, ciertos aminoácidos de una proteína están enterrados en la proteína y no tendrán interacción con la solución que los rodea. El PI 3D tiene en cuenta la estructura 3D de la proteína y

proporciona una mejor estimación del valor de pH en el que una proteína, cuando está correctamente plegada, no tiene carga eléctrica neta en la media estadística. (Utilizamos un tampón de pH gradiente de una publicación, por lo que el tampón no es nuestra invención. Pero todavía necesitamos optimizar el proceso de purificación).

- 5 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo biespecífico o antígeno o fragmento de unión a antígeno del mismo también puede prepararse mediante los siguientes métodos:
- 10 (a) seleccionar un primer antígeno y un segundo antígeno, e identificar un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al primer antígeno y un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al segundo antígeno, en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una primera región variable de cadena pesada (VHa) y una primera región variable de cadena ligera (VLa), y el segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una segunda región variable de cadena pesada (VHb) y una segunda región variable de cadena ligera (VLb);
- 15 (b) determinar la secuencia de aminoácidos de VHa, VLa y VLb;
- 15 (c) alinear las secuencias de aminoácidos de VLa y VLb y determinar que la homología de secuencia entre VLa y VLb es inferior al 80 %;
- 20 (d) reemplazar todas las regiones variables de cadena ligera en una biblioteca de anticuerpos de visualización en fagos con VLa, y realizar un cribado contra el segundo antígeno para obtener una tercera región variable de cadena pesada (VHc);
- 25 (e) rediseñar las secuencias VHa y VHc, obteniendo así VHa' y VHc' para aumentar la diferencia de características bioquímicas o biofísicas entre una primera proteína que comprende dos polipéptidos que comprenden cada uno VHa' y dos polipéptidos que comprenden cada uno VLa, y una segunda proteína que comprende dos polipéptidos que comprenden cada uno VHc' y dos polipéptidos que comprenden cada uno VLa; y
- 25 (f) producir un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene dos regiones variables de cadena ligera y dos regiones variables de cadena pesada, en donde las dos regiones variables de cadena ligera comprenden cada una VLa, y las dos regiones variables de cadena pesada comprenden VHa' y VHc' respectivamente.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo biespecífico o antígeno o fragmento de unión a antígeno del mismo también puede prepararse mediante los siguientes métodos:

- 30 (a) seleccionar un primer antígeno y un segundo antígeno, e identificar un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al primer antígeno y un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al segundo antígeno, en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una primera región variable de cadena pesada (VHa) y una primera región variable de cadena ligera (VLa), y el segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una segunda región variable de cadena pesada (VHb) y una segunda región variable de cadena ligera (VLb);
- 35 (b) determinar la secuencia de aminoácidos de VHa, VLa, VHb y VLb;
- 35 (c) alinear las secuencias de aminoácidos de VLa y VLb y determinar que la homología de secuencia entre VLa y VLb es inferior al 80 %;
- 40 (d) reemplazar todas las regiones variables de cadena ligera en una biblioteca de anticuerpos de visualización en fagos con una pluralidad de regiones variables de cadena ligera, en donde las regiones variables de cadena ligera son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idénticas a VLa o VLb;
- 40 (e) realizar un cribado contra el primer y/o el segundo antígeno (por ejemplo, el segundo antígeno);
- 45 (f) seleccionar una región variable de cadena ligera (VLc) común y una tercera región variable de cadena pesada (VHc), en donde VHa-VLc se une al primer antígeno con una afinidad deseada y VHc VLc se une al segundo antígeno con una afinidad deseada;
- 50 (g) rediseñar las secuencias VHa y VHc, obteniendo así VHa' y VHc' para aumentar la diferencia de características bioquímicas o biofísicas entre una primera proteína que comprende dos polipéptidos que comprenden cada uno VHa' y dos polipéptidos que comprenden cada uno VLc, y una segunda proteína que comprende dos polipéptidos que comprenden cada uno VHc' y dos polipéptidos que comprenden cada uno VLc; y
- 50 (h) producir un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene dos regiones variables de cadena ligera y dos regiones variables de cadena pesada, en donde las dos regiones variables de cadena ligera comprenden cada una VLc, y las dos regiones variables de cadena pesada comprenden VHa' y VHc' respectivamente.
- 55 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, si VHa-VLc no puede unirse al primer antígeno con una afinidad deseada, se pueden realizar pasos adicionales. Por ejemplo, si VLc es al menos 80 % idéntico a VLa, se puede diseñar una nueva cadena ligera común. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el proceso comienza con VLa, y los aminoácidos pueden mutarse al aminoácido en VLc según los métodos descritos en este documento (por ejemplo, según la estructura 3D de VLa y VLc).
- 60 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, diseñar una región variable de cadena ligera común implica alinear VLa y VLb y estudiar los diferentes residuos entre VLa y VLb en la misma posición kabat. Si el residuo diferente en VLb no entra en contacto con CDR, residuos de interfaz, residuos canónicos o residuos de la zona de vernier en la estructura B Fv, los residuos en VLb se mutan al residuo en la misma posición kabat en VLa. De lo contrario, se conservan los residuos en VLb.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, rediseñar una región variable de cadena pesada implica usar BioLuminate para calcular el PI 3D de Fv A y Fv B, y mutar residuos no CDR, no canónicos, no de interfaz y no de zona vernier para hacer que el Fv que tiene un PI 3D alto sea incluso más alto y el que tiene un PI 3D bajo sea incluso más bajo.

5

Cómo utilizar BioLuminate se puede encontrar, por ejemplo, en la guía del usuario de BioLuminate como referencia.

Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

10 La presente divulgación proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDR), regiones variables de cadena pesada, regiones variables de cadena ligera, cadenas pesadas o cadenas ligeras descritas en este documento. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno son anticuerpos biespecíficos desequilibrados y sus fragmentos de unión al antígeno.

15

En general, los anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas) están formados por dos clases de cadenas polipeptídicas: cadenas ligeras y cadenas pesadas. Un anticuerpo no limitante de la presente divulgación puede ser un

20 anticuerpo intacto de cuatro cadenas de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La cadena pesada del anticuerpo puede ser de cualquier isótipo, incluidos IgM, IgG, IgE, IgA o IgD, o un subisótipo, incluidos IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE1, IgE2, etc. La cadena ligera puede ser una cadena ligera kappa o una

25 cadena ligera lambda. Un anticuerpo puede estar compuesto por dos copias idénticas de una cadena ligera y/o dos copias idénticas de una cadena pesada. Las cadenas pesadas, que contienen cada una un dominio variable (o región variable, VH) y múltiples dominios constantes (o regiones constantes), se unen entre sí a través de enlaces disulfuro dentro de sus dominios constantes para formar el "tallo" del anticuerpo. Las cadenas ligeras, que contienen cada una un dominio variable

30 (o región variable, VL) y un dominio constante (o región constante), se unen a una cadena pesada a través de la unión disulfuro. La región variable de cada cadena ligera está alineada con la región variable de la cadena pesada a la que está unida. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas contienen tres regiones hipervariables intercaladas entre regiones marco (FR) más conservadas.

35 Estas regiones hipervariables, conocidas como regiones determinantes complementarias (CDR), forman bucles que comprenden la superficie principal de unión al antígeno del anticuerpo. Las cuatro regiones del marco adoptan en gran medida una conformación de lámina beta y los CDR forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Los CDR de cada cadena se mantienen en estrecha proximidad con las regiones marco y, junto con los CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación de la región de unión al antígeno.

35

40 Los métodos para identificar las regiones CDR de un anticuerpo mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo son bien conocidos y se utilizan comúnmente varias definiciones de las CDR. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia, y la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones del bucle estructural. Estos métodos y definiciones se describen, por ejemplo, en Martin, "Protein sequence and structure analysis of antibodies variable domains", Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001, pp. 422-439; Abhinandan *et al.*, "Analysis and improvements to Kabat and structurely correct numbering of antibodies variable domains", Molecular immunology 45.14 (2008), pp. 3832-3839; Wu, TT y Kabat, EA (1970), J. Exp. Med. 132, pp. 211-250; Martin *et al.*, *Methods Enzymol.* 203, pp. 121-53 (1991); Morea *et al.*, *Biophys Chem.* 68(1-3):9-16 (oct. 1997); Morea *et al.*, *J Mol Biol.* 275(2):269-94 (ene. 1998); Chothia *et al.*, *Nature* 342(6252):877-83 (diciembre de 1989); Ponomarenko y Bourne, *BMC Structural Biology* 7:64 (2007). A menos que se indique específicamente en la presente divulgación, la numeración Kabat se utiliza en la presente divulgación como predeterminada.

45 Los CDR son importantes para reconocer un epítopo de un antígeno. Como se utiliza en este documento, un "epítopo" es la porción más pequeña de una molécula objetivo capaz de ser unida específicamente por el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo. El tamaño mínimo de un epítopo puede ser de aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos, pero estos aminoácidos no necesitan estar en una secuencia lineal consecutiva de la estructura primaria del antígeno, ya que el epítopo puede depender de la configuración tridimensional de un antígeno basada en la estructura secundaria y terciaria del antígeno.

55 50 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina intacta (por ejemplo, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA). Las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) están altamente conservadas y difieren en su región constante, particularmente en sus bisagras y dominios CH2 superiores. Las secuencias y diferencias de las subclases de IgG son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Vidarsson *et al.*, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions". Frontiers in Immunology 5 (2014); Irani *et al.*, "Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases". Molecular immunology 67.2 (2015): 171-182; Shakib, Farouk, ed. The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Elsevier, 2016.

60 65 El anticuerpo también puede ser una molécula de inmunoglobulina derivada de cualquier especie (por ejemplo, humano, roedor, ratón, rata, camélido). Los anticuerpos descritos en este documento también incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos polyclonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos y anticuerpos quiméricos que incluyen un

- dominio de unión de inmunoglobulina fusionado a otro polipéptido. El término "dominio de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" es una porción de un anticuerpo que conserva la actividad de unión específica del anticuerpo intacto, es decir, cualquier porción de un anticuerpo que sea capaz de unirse específicamente a un epítopo en la molécula objetivo del anticuerpo intacto. Incluye, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')2 y variantes de estos fragmentos. Así, en algunos ejemplos 5 que no se reivindican como tales, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, un scFv, un Fv, un Fd, un dAb, un anticuerpo biespecífico, un scFv biespecífico, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpos y cualquier polipéptido que incluya un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión de anticuerpo. 10 Los ejemplos no limitantes de dominios de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, las CDR de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo intacto, las regiones variables de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo intacto, cadenas pesadas o ligeras de longitud completa de un anticuerpo intacto, o una CDR individual de la cadena pesada o de la cadena ligera de un anticuerpo intacto.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el scFv tiene dos dominios variables de cadena pesada y dos 15 dominios variables de cadena ligera. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el scFv tiene dos regiones de unión a antígeno (regiones de unión a antígeno: A y B), y las dos regiones de unión a antígeno pueden unirse a los respectivos antígenos objetivo con diferentes afinidades.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el fragmento de unión al antígeno puede formar parte de un 20 receptor de antígeno químérico (CAR). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los receptores de antígeno químérico son fusiones de fragmentos variables de cadena única (scFv) como se describe en este documento, fusionados al dominio transmembrana y endodomino CD3-zeta. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el receptor de antígeno químérico también comprende dominios de señalización intracelular de varios receptores de proteínas 25 coestimuladoras (por ejemplo, CD28, 41BB, ICOS). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el receptor de antígeno químérico comprende múltiples dominios de señalización, por ejemplo, CD3z-CD28-41BB o CD3z-CD28-OX40, para aumentar la potencia. Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona además células (por ejemplo, células T) que expresan los receptores de antígenos químéricos como se describe en este documento.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígenos pueden 30 unirse a dos antígenos diferentes o dos epítopos diferentes.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender una, dos o tres CDR de región variable de cadena pesada seleccionadas de la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 11 y Tabla 12. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a 35 antígeno de los mismos pueden comprender una, dos o tres CDR de región variable de cadena ligera seleccionadas de la Tabla 3, la Tabla 13 y la Tabla 14.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos pueden tener una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2, 3, en donde la región CDR1 40 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos CDR1 de VH seleccionada, la región CDR2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos CDR2 de VH seleccionada, y la región CDR3 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos CDR3 de VH seleccionada, y una región variable de cadena ligera 45 (VL) que comprende las CDR 1, 2, 3, en donde la región CDR1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos CDR1 de VL seleccionada, la región CDR2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos CDR2 de VL seleccionada, y la región CDR3 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos CDR3 de VL 50 seleccionada. Las secuencias de aminoácidos 1, 2 y 3 de los CDR de VH seleccionados se muestran en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 11 y la Tabla 12, y las secuencias de aminoácidos 1, 2 y 3 de los CDR de VL seleccionados se muestran en la Tabla 3, la Tabla 13 y la Tabla 14.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno descrito en este 55 documento puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene uno, dos o tres de los CDR seleccionados de la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 11 y Tabla 12 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno descrito en este 60 documento puede contener un dominio variable de cadena ligera que contiene uno, dos o tres de los CDR seleccionados de la Tabla 3, la Tabla 13 y la Tabla 14 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos.
- Las inserciones, eliminaciones y sustituciones pueden estar dentro de la secuencia CDR, o en uno o ambos extremos terminales de la secuencia CDR.
- 65 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación se pueden modificar en la región Fc para proporcionar funciones efectoras o vida media sérica deseadas.

La multimerización de anticuerpos puede lograrse a través de la agregación natural de anticuerpos o mediante técnicas de unión química o recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un cierto porcentaje de preparaciones de anticuerpos purificados (por ejemplo, moléculas de IgG1 purificadas) forman espontáneamente agregados de proteínas que contienen homodímeros de anticuerpos y otros multímeros de anticuerpos de orden superior.

- 5 Cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento se pueden conjugar con una molécula estabilizadora (por ejemplo, una molécula que aumenta la vida media del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en un sujeto o en solución). Los ejemplos no limitantes de moléculas estabilizadoras incluyen: un polímero (por ejemplo, un polietilenglicol) o una proteína (por ejemplo, albúmina sérica, como la albúmina sérica humana).
- 10 La conjugación de una molécula estabilizadora puede aumentar la vida media o extender la actividad biológica de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo de tejidos o cuando se almacena como una composición farmacéutica) o *in vivo* (por ejemplo, en un ser humano).
- 15 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) descritos en este documento pueden conjugarse con un agente terapéutico. El conjugado anticuerpo-fármaco que comprende el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno puede unirse covalentemente o no covalentemente a un agente terapéutico. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el agente terapéutico es un agente citotóxico o citostático (p. ej., citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina, maitansinoides como DM-1 y DM-4, diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirrubicina y ciclofosfamida y análogos).
- 20

Características de los anticuerpos

- 25 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) como se describe en este documento pueden aumentar la respuesta inmunitaria. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en este documento pueden aumentar la respuesta inmunitaria, la actividad o el número de células T (por ejemplo, células CD3+, células CD8+ y/o células CD4+) en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o 20 veces.
- 30
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en este documento pueden disminuir la actividad o el número de células T en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o 20 veces.
- 35 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en este documento no inducen una respuesta inmunitaria en células normales (por ejemplo, células no tumorales) o en ausencia de células tumorales.
- 40 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) pueden unirse a PD-L1 o PD-L2. Por tanto, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en este documento pueden bloquear la unión entre PD-1 y PD-L1 y/o la unión entre PD-1 y PD-L2. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, al unirse a PD-L1 o PD-L2, el anticuerpo puede inhibir la vía de señalización de PD-1 y regular positivamente la respuesta inmunitaria. Por tanto, en algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tal como se describe en este documento son antagonistas de PD-1. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son agonistas de PD-1.
- 45

- 50 En algunas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) pueden unirse a CD3. De este modo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en este documento pueden reclutar células T a una célula diana.

- 55 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo (o sus fragmentos de unión al antígeno) se une específicamente a un antígeno (por ejemplo, una proteína humana, una proteína de mono y/o una proteína de ratón) con una tasa de disociación (koff) de menos de 0,1 s⁻¹, menos de 0,01 s⁻¹, menos de 0,001 s⁻¹, menos de 0,0001 s⁻¹ o menos de 0,00001 s⁻¹. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la tasa de disociación (koff) es mayor que 0,01 s⁻¹, mayor que 0,001 s⁻¹, mayor que 0,0001 s⁻¹, mayor que 0,00001 s⁻¹ o mayor que 0,000001 s⁻¹. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, las tasas de asociación cinética (kon) son mayores que 1 x 10²/Ms, mayores que 1 x 10³/Ms, mayores que 1 x 10⁴/Ms, mayores que 1 x 10⁵/Ms o mayores que 1 x 10⁶/Ms. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, las tasas de asociación cinética (kon) son menores que 1 x 10⁵/Ms, menores que 1 x 10⁶/Ms o menores que 1 x 10⁷/Ms.

- 60
- 65 Las afinidades se pueden deducir del cociente de las constantes de velocidad cinética (Kd=koff/kon). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, Kd es menor que 1 x 10⁻⁴ M, menor que 1 x 10⁻⁵ M, menor que 1 x 10⁻⁶ M, menor que 1 x 10⁻⁷ M, menor que 1 x 10⁻⁸ M, menor que 1 x 10⁻⁹ M, o menor que 1 x 10⁻¹⁰ M. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la Kd es menor que 50 nM, 30 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o

1 nM. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, Kd es mayor que 1×10^{-4} M, mayor que 1×10^{-5} M, mayor que 1×10^{-6} M, mayor que 1×10^{-7} M, mayor que 1×10^{-8} M, mayor que 1×10^{-9} M, mayor que 1×10^{-10} M, mayor que 1×10^{-11} M, o mayor que 1×10^{-12} M. Además, Ka se puede deducir de Kd mediante la fórmula $Ka = 1/Kd$.

- 5 Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno incluyen, por ejemplo, ELISA, RIA y resonancia plasmónica de superficie (SPR).

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales se determinan estabilidades térmicas. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describe en este documento pueden tener una Tm mayor que 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 °C.

10 Como la IgG puede describirse como una proteína multidominio, la curva de fusión a veces muestra dos transiciones, o tres transiciones, con una primera temperatura de desnaturación, Tm D1, y una segunda temperatura de desnaturación Tm D2, y opcionalmente una tercera temperatura de desnaturación Tm D3.

15 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describe en este documento tienen una Tm D1 mayor que 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 °C. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describe en este documento tienen una Tm D2 mayor que 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 °C. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describe en este documento tienen una Tm D3 mayor que 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 °C.

20 25 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, Tm, Tm D1, Tm D2, Tm D3 son menores que 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 °C.

30 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describe en este documento no comienzan a formar agregación cuando la temperatura es inferior a 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 °C. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, Tagg266 o Tagg473 es menor que 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 °C.

35 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describe en este documento tienen un pl mayor que 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8 o 9,9. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno como se describe en este documento tienen un pl menor que 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8 o 9,9.

40 45 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo tiene un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI%) que es mayor que 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 %. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el anticuerpo tiene un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral que es inferior al 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o 200 %. El TGI% se puede determinar, por ejemplo, a los 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días después de iniciado el tratamiento, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses después de iniciado el tratamiento. Tal como se utiliza en este documento, el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI%) se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$TGI (\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$$

50 55 Ti es el volumen tumoral promedio en el grupo de tratamiento en el día i. T0 es el volumen tumoral promedio en el grupo de tratamiento en el día cero. Vi es el volumen tumoral promedio en el grupo de control en el día i. V0 es el volumen tumoral promedio en el grupo de control en el día cero.

60 65 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden aumentar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o 20 veces.

70 75 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o 20 veces.

80 85 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden aumentar la tasa de internalización en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o 20 veces.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden aumentar la tasa de fagocitosis en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o 20 veces.

- 5 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden mejorar la función de las células T, por ejemplo, aumentando la proliferación de las células T efectoras y/o aumentando la producción de interferón gamma por parte de la célula T efectora (por ejemplo, en comparación con la proliferación y/o la producción de citocinas antes del tratamiento con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno).
- 10 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno mejoran la función de las células T efectoras CD4+, por ejemplo, aumentando la proliferación de las células T efectoras CD4+ y/o aumentando la producción de interferón gamma por parte de las células T efectoras CD4+ (por ejemplo, en comparación con la proliferación y/o la producción de citocinas antes del tratamiento con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aumentan el número de células T efectoras CD4+ intratumorales (infiltrantes) (p. ej., número total de células T efectoras CD4+ o, p. ej., porcentaje de células CD4+ en células CD45+), p. ej., en comparación con el número de células T CD4+ intratumorales (infiltrantes) antes del tratamiento con anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aumentan el número de células T efectoras CD4+ intratumorales (infiltrantes) que expresan interferón gamma (p. ej., células CD4+ que expresan interferón gamma total, o p. ej., porcentaje de células CD4+ que expresan interferón gamma en el total de células CD4+), p. ej., en comparación con el número de células T CD4+ intratumorales (infiltrantes) que expresan interferón gamma antes del tratamiento.

25 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aumentan el número de células T efectoras CD8+ intratumorales (infiltrantes) (p. ej., número total de células T efectoras CD8+ o, p. ej., porcentaje de CD8+ en células CD45+), p. ej., en comparación con el número de células T efectoras CD8+ intratumorales (infiltrantes) antes del tratamiento. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aumentan el número de células T efectoras CD8+ intratumorales (infiltrantes) que expresan interferón gamma (p. ej., porcentaje de células CD8+ que expresan interferón gamma en el total de células CD8+), p. ej., en comparación con el número de células T CD8+ intratumorales (infiltrantes) que expresan interferón gamma antes del tratamiento con el anticuerpo.

30 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno mejoran la función de las células T de memoria, por ejemplo, aumentando la proliferación de las células T de memoria y/o aumentando la producción de citocinas (por ejemplo, interferón gamma) por parte de la célula de memoria.

35 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno tienen una región Fc funcional. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la función efectora de una región Fc funcional es la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la función efectora de una región Fc funcional es la fagocitosis. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la función efectora de una región Fc funcional es ADCC y fagocitosis. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la región Fc es IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana.

40 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden inducir apoptosis.

45 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno no tienen una región Fc funcional. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv.

50 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son anticuerpos humanizados. El porcentaje de humanización significa el porcentaje de identidad de la secuencia de la región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera en comparación con las secuencias de anticuerpos humanos en la base de datos del Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el porcentaje de humanización es mayor del 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 %. Se conoce en la técnica una descripción detallada sobre cómo determinar el porcentaje de humanización, que se describe, por ejemplo, en Jones, Tim D., *et al.* "The INNs and outs of antibody nonproprietary names". MAbs. Vol. 8. N.º 1. Taylor & Francis, 2016. Un alto porcentaje de humanización a menudo tiene varias ventajas, por ejemplo, es más seguro y más efectivo en humanos, es más probable que sea tolerado por un sujeto humano y/o es menos probable que tenga efectos secundarios. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son anticuerpos humanos.

Vectores recombinantes

65 La presente divulgación también proporciona vectores recombinantes (por ejemplo, vectores de expresión) que incluyen un polinucleótido aislado divulgado en este documento (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido

divulgado en este documento), células huésped en las que se introducen los vectores recombinantes (es decir, de modo que las células huésped contengan el polinucleótido y/o un vector que comprenda el polinucleótido), y la producción de polipéptidos de anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos mediante técnicas recombinantes.

- 5 Como se utiliza en este documento, un "vector" es cualquier construcción capaz de administrar uno o más polinucleótidos de interés a una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped. Un "vector de expresión" es capaz de administrar y expresar uno o más polinucleótidos de interés como un polipéptido codificado en una célula huésped en la que se ha introducido el vector de expresión. Así, en un vector de expresión, el polinucleótido de interés se posiciona para su expresión en el vector al estar vinculado operativamente con elementos reguladores tales como un promotor, un 10 potenciador y/o una cola de poli-A, ya sea dentro del vector o en el genoma de la célula huésped en o cerca o flanqueando el sitio de integración del polinucleótido de interés, de modo que el polinucleótido de interés se traducirá en la célula huésped introducida con el vector de expresión.
- 15 Un vector puede introducirse en la célula huésped mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroporación, transfección química (por ejemplo, DEAE-dextrano), transformación, transfección e infección y/o transducción (por ejemplo, con virus recombinante). Por tanto, los ejemplos no limitantes de vectores incluyen vectores virales (que pueden usarse para generar virus recombinantes), ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos, vectores de fagos y vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensadores catiónicos.
- 20 En algunas implementaciones, un polinucleótido divulgado en este documento (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido divulgado en este documento) se introduce utilizando un sistema de expresión viral (por ejemplo, virus vaccinia u otro virus de la viruela, retrovirus o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus no patógeno (defectuoso), competente en replicación, o puede utilizar un virus defectuoso en replicación. En el último caso, la propagación viral generalmente ocurrirá sólo en células complementarias que empaquetan el virus. Se describen sistemas adecuados, por 25 ejemplo, en Fisher-Hoch *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexner *et al.*, 1989, Ann. NY Acad Sci. 569:86-103; Flexner *et al.*, 1990, Vaccine, 8:17-21; Patentes de EE. UU. n.º 4.603.112, 4.769.330 y 5.017.487; WO 89/01973; Patente de EE. UU. n.º 4.777.127; GB 2.200.651; EP 0.345.242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988; Rosenfeld y otros, 1991, Science, 252:431-434; Kolls y otros, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215-219; Kass-Eisler y otros, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11498-11502; Guzmán y otros, 1993, Circulation, 88:2838-2848; 30 y Guzmán y otros, 1993, Cir. Res., 73:1202-1207. Las técnicas para incorporar ADN en dichos sistemas de expresión son bien conocidas por aquellos con conocimientos ordinarios en la materia. El ADN también puede estar "desnudo", como se describe, por ejemplo, en Ulmer *et al.*, 1993, Science, 259:1745-1749, y Cohen, 1993, Science, 259:1691-1692. La captación de ADN desnudo se puede incrementar recubriendo el ADN con perlas biodegradables que se transportan eficientemente a las células.
- 35 Para la expresión, el inserto de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o que codifica un polipéptido descrito en este documento se puede unir operativamente a un promotor apropiado (por ejemplo, un promotor heterólogo), tal como el promotor PL del fago lambda, el promotor E. los promotores lac, trp y tac de coli, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y los promotores de LTR retrovirales, por nombrar algunos. El experto en la técnica conoce 40 otros promotores adecuados. Los constructos de expresión pueden contener además sitios para el inicio y la terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de las transcripciones maduras expresadas por los constructos puede incluir un codón de inicio de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) ubicado apropiadamente al final del polipéptido que se va a traducir.
- 45 Como se indica, los vectores de expresión pueden incluir al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen la resistencia a la dihidrofolato reductasa o a la neomicina para el cultivo de células eucariotas y los genes de resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, entre otros, células bacterianas, como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, como células de levadura; células de insectos, como células S2 de *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células animales, como células CHO, COS, de melanoma de Bowes y HK 293; y células vegetales. Los medios y 50 condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas en este documento son conocidos en la técnica.
- Los vectores no limitantes para uso en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene; y pTRC99a, 55 pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia. Los vectores eucariotas no limitantes incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Al experto en la materia le resultarán fácilmente evidentes otros vectores adecuados.
- 60 Los promotores bacterianos no limitantes adecuados para su uso incluyen promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores lambda PR y PL y el promotor trp. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor temprano inmediato del CMV, el promotor de la timidina quinasa del HSV, los promotores tempranos y tardíos del SV40, los promotores de LTR retrovirales, como los del virus del sarcoma de Rous (RSV), y los promotores de metalotioneína, como el promotor de metalotioneína-I del ratón.
- 65 En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden utilizar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, como el factor alfa, la alcohol oxidasa y la PGH. Para revisiones, consulte Ausubel *et al.* (1989) Current

Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y, y Grant *et al.*, *Methods Enzymol.*, 153: 516-544 (1997).

- 5 La introducción del constructo en la célula huésped se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Estos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, como Davis *et al.*, *Basic-Methods In Molecular Biology* (1986).
- 10 La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo de la presente divulgación por eucariotas superiores se puede incrementar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en *cis*, normalmente de entre 10 y 300 pb, que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula huésped determinado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador SV40, que se encuentra en el lado tardío del origen de replicación en los pares de bases 100 a 270, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus.
- 15 15 Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción apropiadas al polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.
- 20 20 El polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) se puede expresar en una forma modificada, como una proteína de fusión (por ejemplo, una fusión GST) o con una etiqueta de histidina, y puede incluir no solo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, se puede agregar una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N del polipéptido para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula huésped, durante la purificación o durante la manipulación y el almacenamiento posteriores. Además, se pueden agregar fracciones peptídicas al polipéptido para facilitar la purificación. Estas regiones pueden eliminarse antes de la preparación final del polipéptido. La adición de fracciones peptídicas a polipéptidos para generar secreción o excreción, mejorar la estabilidad y facilitar la purificación, entre otras, son técnicas familiares y rutinarias en la técnica.
- 30 30 La divulgación también proporciona una secuencia de ácido nucleico que es al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquier secuencia de nucleótidos como se describe en este documento, y una secuencia de aminoácidos que es al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntico a cualquier secuencia de aminoácidos como se describe en este documento.
- 35 35 La divulgación también proporciona una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con cualquier secuencia de nucleótidos como se describe en este documento, y una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % a cualquier secuencia de aminoácidos como se describe en este documento.
- 40 40 La divulgación también proporciona una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con cualquier secuencia de nucleótidos como se describe en este documento, y una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % a cualquier secuencia de aminoácidos como se describe en este documento.
- 45 45 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la divulgación se relaciona con secuencias de nucleótidos que codifican cualquier péptido que se describe en este documento, o cualquier secuencia de aminoácidos que esté codificada por cualquier secuencia de nucleótidos como se describe en este documento. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la secuencia de ácido nucleico es menor de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 o 600 nucleótidos. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la secuencia de aminoácidos es menor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350 o 400 residuos de aminoácidos.
- 50 50 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la secuencia de aminoácidos (i) comprende una secuencia de aminoácidos; o (ii) consiste en una secuencia de aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos es cualquiera de las secuencias como se describe en este documento.
- 55 55 En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la secuencia de ácido nucleico (i) comprende una secuencia de ácido nucleico; o (ii) consiste en una secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de ácido nucleico es cualquiera de las secuencias como se describe en este documento.
- 60 60 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para una alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines de comparación). La longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es al menos el 80 % de la longitud de la secuencia de referencia y, en algunos ejemplos que no se reivindican como tales, es al menos el 90 %, 95 % o 100 %. Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos

en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa aquí, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. Para los fines de la presente invención, la comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando una matriz de puntuación BLOSUM 62 con una penalización de espacio de 12, una penalización de extensión de espacio de 4 y una penalización de espacio de desplazamiento de marco de 5.

También se puede determinar el porcentaje de homología de secuencia (por ejemplo, homología de secuencia de aminoácidos u homología de ácidos nucleicos). En la técnica se conoce cómo determinar el porcentaje de homología de secuencia. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, residuos de aminoácidos conservados con propiedades fisicoquímicas similares (porcentaje de homología), por ejemplo. La leucina y la isoleucina se pueden utilizar para medir la similitud de secuencias. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen propiedades fisicoquímicas similares. Estas familias incluyen, por ejemplo, aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, pralina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). El porcentaje de homología, en muchos casos, es mayor que el porcentaje de identidad.

Métodos de producción de anticuerpos

Un fragmento aislado de proteína humana (por ejemplo, CD55, CD3, antígeno específico del cáncer o antígeno asociado al cáncer) se puede utilizar como inmunógeno para generar anticuerpos utilizando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policloniales y monoclonales. Los anticuerpos policloniales pueden generarse en animales mediante inyecciones múltiples (por ejemplo, inyecciones subcutáneas o intraperitoneales) de un péptido o proteína antigenica. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el péptido o proteína antigenica se inyecta con al menos un adyuvante. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el péptido o proteína antigenica se puede conjugar con un agente que sea inmunogénico en la especie que se va a inmunizar. A los animales se les puede inyectar el péptido o proteína antigenica más de una vez (por ejemplo, dos, tres o cuatro veces).

Se puede utilizar el polipéptido o proteína de longitud completa o, alternativamente, se pueden utilizar fragmentos de péptidos antigenicos del mismo como inmunógenos. El péptido antigenico de una proteína comprende al menos 8 (por ejemplo, al menos 10, 15, 20 o 30) residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína y abarca un epítopo de la proteína de tal manera que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunológico específico con la proteína.

Normalmente se utiliza un inmunógeno para preparar anticuerpos mediante la inmunización de un sujeto adecuado (por ejemplo, un ser humano o un animal transgénico que expresa al menos un locus de inmunoglobulina humana). Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, un polipéptido expresado de forma recombinante o sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulante similar.

Los anticuerpos policloniales se pueden preparar como se describió anteriormente inmunizando a un sujeto adecuado con un polipéptido o un péptido antigenico del mismo (por ejemplo, parte de la proteína) como inmunógeno. El título de anticuerpos en el sujeto inmunizado se puede controlar a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, como por ejemplo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando el polipéptido o péptido inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpos pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse aún más mediante técnicas bien conocidas, como la cromatografía de proteína A o proteína G para obtener la fracción IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos específicos son más altos, se pueden obtener células productoras de anticuerpos del sujeto y usarlas para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, como la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler *et al.* (Nature 256:495-497, 1975), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, Immunol. Hoy 4:72, 1983), la técnica EBV-hibridoma (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96, 1985), o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (véase, en general, Current Protocols in Immunology, 1994, Coligan *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal se detectan examinando los sobrenadantes del cultivo de hibridoma en busca de anticuerpos que se unan al polipéptido o epítopo de interés, por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA estándar.

Se pueden preparar variantes de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica un anticuerpo humano, humanizado o químérico, o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en este documento, o mediante síntesis de péptidos. Estas variantes incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos que conforman el sitio de unión al antígeno del anticuerpo o un dominio de unión al antígeno. En una

- 5 población de tales variantes, algunos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno tendrán mayor afinidad por la proteína objetivo. Se puede realizar cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y/o combinaciones para llegar a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que tenga una mayor afinidad de unión por el objetivo. Los cambios de aminoácidos introducidos en el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno también pueden alterar o introducir nuevas modificaciones postraduccionales en el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, como cambiar (por ejemplo, aumentar o disminuir) el número de sitios de glicosilación, cambiar el tipo de sitio de glicosilación (por ejemplo, cambiar la secuencia de aminoácidos de manera que las enzimas presentes en una célula unan un azúcar diferente) o introducir nuevos sitios de glicosilación.
- 10 Los anticuerpos descritos en este documento pueden derivarse de cualquier especie de animal, incluidos los mamíferos. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos nativos incluyen anticuerpos derivados de humanos, primates, por ejemplo, monos y simios, vacas, cerdos, caballos, ovejas, camélidos (por ejemplo, camellos y llamas), pollos, cabras y roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámsteres y conejos), incluidos roedores transgénicos modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos.
- 15 La visualización de fagos (panning) se puede utilizar para optimizar las secuencias de anticuerpos con las afinidades de unión deseadas. En esta técnica, un gen que codifica un Fv de cadena simple (que comprende VH o VL) se puede insertar en un gen de proteína de cubierta de fago, lo que hace que el fago "muestre" el scFv en su exterior mientras que contiene el gen de la proteína en su interior, lo que da como resultado una conexión entre el genotipo y el fenotipo. Estos fagos exhibidores pueden luego compararse con antígenos objetivo, con el fin de detectar la interacción entre los sitios de unión del antígeno exhibido y el antígeno objetivo. De este modo, se pueden seleccionar y amplificar grandes bibliotecas de proteínas en un proceso denominado selección *in vitro*, y se pueden obtener secuencias de anticuerpos con las afinidades de unión deseadas.
- 20 25 Los anticuerpos humanos y humanizados incluyen anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de (o que tienen la misma secuencia de aminoácidos que las derivadas de) secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910
- Un anticuerpo humanizado, típicamente tiene un marco humano (FR) injertado con CDR no humanos. Por tanto, un anticuerpo humanizado tiene una o más secuencias de aminoácidos introducidas en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "de importación", que normalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente, por ejemplo, sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988). En consecuencia, los anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químéricos en los que sustancialmente menos que un dominio V humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos de ratón en los que algunos residuos de CDR y algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos humanos.
- Además, es importante que los anticuerpos sean humanizados y conserven una alta especificidad y afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, se pueden preparar anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay programas informáticos disponibles que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR de las secuencias del receptor y de importación para lograr la característica de anticuerpo deseada, como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos objetivo.
- La identidad u homología con respecto a una secuencia original es generalmente el porcentaje de residuos de aminoácidos presentes dentro de la secuencia candidata que son idénticos a una secuencia presente dentro del anticuerpo o fragmento humano, humanizado o químérico, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, se puede realizar una modificación covalente al anticuerpo o a su fragmento de unión al antígeno. Estas modificaciones covalentes pueden realizarse mediante síntesis química o enzimática, o mediante escisión enzimática o química. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo o fragmento con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N o C-terminales.

- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) medidas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de los residuos de la región Fc; o posición 314 en la numeración de Kabat); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente ± 3 aminoácidos aguas arriba o aguas abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencia en los anticuerpos. Estas variantes de fucosilación pueden haber mejorado la función ADCC. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, para reducir la heterogeneidad de los glicanos, la región Fc del anticuerpo puede modificarse aún más para reemplazar la asparagina en la posición 297 con alanina (N297A).
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, para facilitar la eficiencia de la producción evitando el intercambio del brazo Fab, la región Fc de los anticuerpos se diseñó además para reemplazar la serina en la posición 228 (numeración UE) de IgG4 con pralina (S228P). Una descripción detallada sobre la mutación S228 se describe, por ejemplo, en Silva *et al.* La mutación S228P impide el intercambio de brazos Fab de IgG4 *in vivo* e *in vitro*, como se demostró mediante una combinación de nuevos inmunoensayos cuantitativos y la preparación de una matriz fisiológica. *Journal of Biological Chemistry* 290.9 (2015): 5462-5469.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los métodos descritos aquí están diseñados para producir un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos se pueden crear diseñando la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, la interfaz puede contener al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, como los homodímeros. Este método se describe, por ejemplo, en el documento WO 96/27011.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, se sustituyen uno o más residuos de aminoácidos en la porción CH3 de la IgG. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, una cadena pesada tiene una o más de las siguientes sustituciones Y349C y T366W. La otra cadena pesada puede tener una o más de las siguientes sustituciones E356C, T366S, L368A e Y407V. Además, también se puede introducir una sustitución (-ppcpScp-->-ppcpPcp-) en las regiones de bisagra de ambas IgG sustituidas. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, una cadena pesada tiene una sustitución T366Y (perilla) y la otra cadena pesada tiene una subestación Y407T (agujero).
- Además, se puede utilizar una cromatografía de intercambio aniónico para purificar anticuerpos biespecíficos. La cromatografía de intercambio aniónico es un proceso que separa sustancias en función de sus cargas utilizando una resina de intercambio iónico que contiene grupos con carga positiva, como grupos dietilaminoetilo (DEAE). En solución, la resina está recubierta de contraiones cargados positivamente (cationes). Las resinas de intercambio aniónico se unirán a las moléculas cargadas negativamente, desplazando el contraión. La cromatografía de intercambio aniónico se puede utilizar para purificar proteínas en función de su punto isoelectrónico (pI). El punto isoelectrónico se define como el pH en el que una proteína no tiene carga neta. Cuando el pH > pI, una proteína tiene una carga neta negativa y cuando el pH < pI, una proteína tiene una carga neta positiva. Por tanto, en algunos ejemplos que no se reivindican como tales, se puede introducir una sustitución de aminoácidos diferente en dos cadenas pesadas, de modo que el pI para el homodímero que comprende dos Brazos A y el pI para el homodímero que comprende dos Brazos B sean diferentes. El pI para el anticuerpo biespecífico que tiene el brazo A y el brazo B estará en algún lugar entre los dos pI de los homodímeros. De esta forma, los dos homodímeros y el anticuerpo biespecífico pueden liberarse en diferentes condiciones de pH. La presente divulgación muestra que se pueden introducir algunas sustituciones de residuos de aminoácidos en las cadenas pesadas para ajustar pI.
- Así, en algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el residuo de aminoácido en la posición de numeración de Kabat 83 es lisina, arginina o histidina. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los residuos de aminoácidos en una o más de las posiciones 1, 6, 43, 81 y 105 (numeración de Kabat) son ácido aspártico o ácido glutámico.
- En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los residuos de aminoácidos en una o más de las posiciones 13 y 105 (numeración de Kabat) son ácido aspártico o ácido glutámico. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, los residuos de aminoácidos en una o más de las posiciones 13 y 42 (numeración de Kabat) son lisina, arginina, histidina o glicina.
- Los anticuerpos biespecíficos también pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado puede acoplarse a la avidina y el otro a la biotina. Los anticuerpos heteroconjugados también pueden fabricarse utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de

reticulación adecuados y las técnicas de reticulación son bien conocidos en la técnica y se describen en la patente de EE. UU. Patente N.º 4.676.980.

5 También se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar mediante enlace químico. Brennan y otros. (Science 229:81, 1985) describe un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')2. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditióles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten luego en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Luego, uno de los derivados Fab' TNB se reconvierte en el tiol 10 Fab' mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado Fab' TNB para formar el anticuerpo biespecífico.

Anticuerpos biespecíficos para uso en métodos de tratamiento

15 Los métodos descritos en este documento incluyen anticuerpos biespecíficos diseñados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos desequilibrados) de fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se proporciona en este documento para su uso en métodos para el tratamiento de trastornos asociados con el cáncer. Generalmente, los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpos biespecíficos diseñados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos desequilibrados) o de fragmentos de unión al antígeno de los mismos, a un sujeto que "necesita" o que se 20 ha determinado que "necesita" dicho tratamiento. Cualquier referencia a un método de tratamiento practicado en el cuerpo humano o animal debe interpretarse como sustancias y composiciones para su uso en dicho tratamiento.

Tal como se utiliza en este contexto, "tratar" significa mejorar al menos un síntoma del trastorno asociado con el cáncer. A menudo, el cáncer produce la muerte; por lo tanto, un tratamiento puede resultar en un aumento de la expectativa de vida (por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años). La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente descrito en este documento (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos desequilibrados) para el tratamiento de una afección asociada con el cáncer dará como resultado una disminución del número de células cancerosas y/o alivio de los síntomas.

30 Tal como se utiliza en este documento, el término "cáncer" se refiere a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizado por un crecimiento celular que prolifera rápidamente. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncológicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. El término "tumor" tal como se utiliza en este documento se refiere a células cancerosas, por ejemplo, una masa de células cancerosas. Los cánceres que pueden tratarse o diagnosticarse utilizando los métodos descritos en este documento incluyen neoplasias malignas de varios sistemas de órganos, como los que afectan al pulmón, mama, tiroides, sistema linfático, gastrointestinal y tracto genitourinario, así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias malignas como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago. En algunas formas de 35 realización, los agentes descritos en este documento están diseñados para tratar o diagnosticar un carcinoma en un sujeto. El término "carcina" es ampliamente reconocido y se refiere a neoplasias malignas de tejidos epiteliales o endocrinos, incluidos carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. En algunas formas de realización, el cáncer es carcinoma renal o melanoma. Los carcinomas ejemplares 40 incluyen aquellos que se forman a partir de tejido del cuello uterino, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término también incluye carcinomas, por ejemplo, que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un "adenocarcinoma" se refiere a un carcinoma derivado del tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles. El término "sarcoma" es actualmente reconocido y se 45 refiere a tumores malignos de derivación mesenquimal.

50 En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer resistente a Rituximab (Rituxan®).

En un aspecto, la divulgación también proporciona métodos para tratar un cáncer en un sujeto, métodos para reducir la tasa de aumento de volumen de un tumor en un sujeto a lo largo del tiempo, métodos para reducir el riesgo de desarrollar 55 una metástasis o métodos para reducir el riesgo de desarrollar una metástasis adicional en un sujeto. En algunas formas de realización, el tratamiento puede detener, retardar, retardar o inhibir la progresión de un cáncer. En algunas formas de realización, el tratamiento puede resultar en la reducción del número, la gravedad y/o la duración de uno o más síntomas del cáncer en un sujeto.

60 En un aspecto, la divulgación presenta métodos que incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un conjugado anticuerpo-fármaco divulgado en este documento a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene, o está identificado o diagnosticado como que tiene, un cáncer, por ejemplo, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer carcinoide, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer 65 de pulmón de células pequeñas, linfoma, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer

renal, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, cáncer uretral o neoplasia maligna hematológica.

5 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente a lo largo de la especificación y describen un animal, humano o no humano, a quien se proporciona tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. La presente invención contempla aplicaciones veterinarias y no veterinarias. Los pacientes humanos pueden ser humanos adultos o humanos jóvenes (por ejemplo, humanos menores de 18 años). Además de los humanos, los pacientes incluyen, entre otros, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, conejos, hurones, gatos, perros y primates. Se incluyen, por ejemplo, primates no humanos (por ejemplo, monos, chimpancés, gorilas y similares), 10 roedores (por ejemplo, ratas, ratones, jiribos, hámsteres, hurones, conejos), lagomorfos, cerdos (por ejemplo, cerdos, cerdos miniatura), equinos, caninos, felinos, bovinos y otros animales domésticos, de granja y de zoológico.

15 En algunas formas de realización, el cáncer es melanoma irresecable o melanoma metastásico, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer de vejiga o cáncer de próstata metastásico refractario a hormonas. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un tumor sólido. En algunas formas de realización, el cáncer es carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), carcinoma de células renales (CCR), cáncer de mama triple negativo (CMTN) o carcinoma colorrectal. En algunas formas de realización, el sujeto tiene linfoma de Hodgkin. En algunas formas de realización, el sujeto tiene cáncer de mama triple negativo (CMTN), cáncer 20 gástrico, cáncer urotelial, carcinoma de células de Merkel o cáncer de cabeza y cuello. En algunas formas de realización, el cáncer es melanoma, carcinoma pancreático, mesotelioma, neoplasias hematológicas, especialmente linfoma no Hodgkin, linfoma, leucemia linfocítica crónica o tumores sólidos avanzados.

25 En algunas formas de realización, las composiciones y métodos divulgados en este documento se pueden usar para el tratamiento de pacientes con riesgo de cáncer. Los pacientes con cáncer pueden identificarse con diversos métodos conocidos en la técnica.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad o dosis suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, incluyendo detener, retardar, retardar o inhibir la progresión de una enfermedad, por ejemplo, un cáncer: Una cantidad efectiva variará dependiendo, por ejemplo, de la edad y el peso corporal de un sujeto al que se va a administrar el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno, los conjugados anticuerpo-fármaco, el polinucleótido que codifica el anticuerpo, el vector que comprende el polinucleótido y/o las composiciones de los mismos, la gravedad de los síntomas y la vía de administración y, por lo tanto, la administración se puede determinar de forma individual.

35 35 Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones: A modo de ejemplo, una cantidad eficaz de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o un conjugado anticuerpo-fármaco es una cantidad suficiente para mejorar, detener, estabilizar, revertir, inhibir, retardar y/o retrasar la progresión de una enfermedad autoinmune o un cáncer en un paciente o es una cantidad suficiente para mejorar, detener, estabilizar, revertir, retardar y/o retrasar la 40 proliferación de una célula (por ejemplo, una célula biopsiada, cualquiera de las células cancerosas descritas en este documento o una línea celular (por ejemplo, una línea de células cancerosas) in vitro: Como se entiende en la técnica, una cantidad efectiva de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o un conjugado anticuerpo-fármaco puede variar, dependiendo, entre otras cosas, del historial del paciente así como de otros factores tales como el tipo (y/o dosis) de anticuerpo utilizado.

45 45 Las cantidades y los programas efectivos para administrar los anticuerpos, los polinucleótidos codificantes de anticuerpos, los conjugados anticuerpo-fármaco y/o las composiciones divulgadas en este documento se pueden determinar empíricamente, y realizar dichas determinaciones está dentro de la habilidad en la técnica: Los expertos en la materia comprenderán que la dosis que se debe administrar variará dependiendo, por ejemplo, del mamífero que recibirá los anticuerpos, polinucleótidos codificantes de anticuerpos, conjugados anticuerpo-fármaco y/o composiciones divulgadas 50 en este documento, la vía de administración, el tipo particular de anticuerpos, polinucleótidos codificantes de anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados anticuerpo-fármaco y/o composiciones divulgadas en este documento utilizados y otros fármacos que se administren al mamífero: Se pueden encontrar instrucciones para seleccionar dosis apropiadas de anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos en la literatura sobre usos terapéuticos de anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos, por ejemplo, *Handbook of Monoclonal Antibodies*, Ferrone *et al.*, eds., Noges Publications, Park Ridge, NJ, 1985, cap: 22 y págs: 303-357; Smith *et al.*, *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, 55 Haber *et al.*, eds., Raven Press, Nueva York, 1977, págs: 365-389.

60 Una dosis diaria típica de una cantidad efectiva de un anticuerpo es de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg: En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la dosis puede ser inferior a 100 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0,5 mg/kg o 0,1 mg/kg: En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la dosis puede ser mayor que 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,05 mg/kg o 0,01 mg/kg: En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, la dosis es de aproximadamente 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0,9 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,2 mg/kg o 0,1 mg/kg.

65

En cualquiera de los métodos descritos en este documento, el al menos un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugados anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados anticuerpo-fármaco o composiciones farmacéuticas descritos en este documento) y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar al sujeto al menos una vez a la semana (por ejemplo, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, una vez al día, dos veces al día o tres veces al día). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, se administran al menos dos anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno diferentes en la misma composición (por ejemplo, una composición líquida). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, al menos un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, conjugados anticuerpo-fármaco y al menos un agente terapéutico adicional se administran en la misma composición (por ejemplo, una composición líquida). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el al menos un agente terapéutico adicional se administran en dos composiciones diferentes (por ejemplo, una composición líquida que contiene al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y una composición oral sólida que contiene al menos un agente terapéutico adicional). En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el al menos un agente terapéutico adicional se administra como una píldora, tableta o cápsula. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el al menos un agente terapéutico adicional se administra en una formulación oral de liberación sostenida.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar al sujeto antes o después de administrar el al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno o composiciones farmacéuticas descritos en este documento): En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el uno o más agentes terapéuticos adicionales y el al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno o composiciones farmacéuticas descritas en este documento) se administran al sujeto de tal manera que existe una superposición en el período bioactivo del uno o más agentes terapéuticos adicionales y el al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento) en el sujeto.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, al sujeto se le puede administrar al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, conjugado anticuerpo-fármaco o composición farmacéutica (p. ej., cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno o composiciones farmacéuticas descritas en este documento) durante un período de tiempo prolongado (p. ej., durante un período de al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o 5 años): Un profesional médico capacitado puede determinar la duración del período de tratamiento utilizando cualquiera de los métodos descritos aquí para diagnosticar o seguir la eficacia del tratamiento (por ejemplo, la observación de al menos un síntoma de cáncer): Como se describe en este documento, un profesional médico capacitado también puede cambiar la identidad y el número (por ejemplo, aumentar o disminuir) de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, conjugados anticuerpo-fármaco (y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales) administrados al sujeto y también puede ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) la dosis o frecuencia de administración de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales) al sujeto basándose en una evaluación de la efectividad del tratamiento (por ejemplo, utilizando cualquiera de los métodos descritos en este documento y conocidos en la técnica).

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto: El agente terapéutico adicional puede comprender uno o más inhibidores seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de B-Raf, un inhibidor de EGFR, un inhibidor de una MEK, un inhibidor de ERK, un inhibidor de K-Ras, un inhibidor de c-Met, un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), un inhibidor de una fosfatidilinositol 3-quinasa (PBK), un inhibidor de una Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor dual de PBK/mTOR, un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) y un inhibidor de la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y/o la isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2): En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la indolamina 2,3-dioxigenasa-1 (IDO1) (por ejemplo, epacadostat).

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el agente terapéutico adicional puede comprender uno o más inhibidores seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de HER3, un inhibidor de LSD1, un inhibidor de MDM2, un inhibidor de BCL2, un inhibidor de CHK1, un inhibidor de la vía de señalización de hedgehog activada y un agente que degrada selectivamente el receptor de estrógeno. En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el agente terapéutico adicional puede comprender uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en trabectedina, nab paclitaxel, trebananib, pazopanib, cediranib, palbociclib, everolimus, fluoropirimidina, IFL, regorafenib, reolisina, Alimta, Zykadia, Sutent, temsirolimus, axitinib, everolimus, sorafenib, Votrient, pazopanib, IMA-901, AGS-003, cabozantinib, vinflunina, un inhibidor de Hsp90, Ad-GM CSF, temazolomida, IL-2, IFNa, vinblastina, talomid, dacarbazine, ciclofosfamida, lenalidomida, azacitidina, lenalidomida, bortezomib, amrubicina, carfilzomib, pralatrexato y enzastaurina.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el agente terapéutico adicional puede comprender uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en un adyuvante, un agonista de TLR, factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, IL-1, HMBG1, un antagonista de IL-10, un antagonista de IL-4, un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-17, un antagonista de HVEM, un agonista de ICOS, un tratamiento dirigido a CX3CL1, un tratamiento dirigido a

CXCL9, un tratamiento dirigido a CXCL10, un tratamiento dirigido a CCL5, un agonista de LFA-1, un agonista de ICAMI y un agonista de selectina.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, se administran al sujeto carboplatino, nab-paclitaxel, paclitaxel, cisplatino, pemetrexed, gemcitabina, FOLFOX o FOLFIRI.

En algunos ejemplos que no se reivindican como tales, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti OX40, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-CTLA-4 o un anticuerpo anti-GITR.

10 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

También se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas que contienen al menos uno (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro) de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o conjugados anticuerpo-fármaco descritos aquí: Dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) de cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o conjugados anticuerpo-fármaco descritos en este documento pueden estar presentes en una composición farmacéutica en cualquier combinación: las composiciones farmacéuticas pueden formularse de cualquier manera conocida en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas se formulan para ser compatibles con la vía de administración prevista (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraperitoneal): Las composiciones pueden incluir un diluyente estéril (por ejemplo, agua estéril o solución salina), un aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos o antifúngicos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético, tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes isotónicos, tales como azúcares (por ejemplo, dextrosa), polialcoholes (por ejemplo, manitol o sorbitol), o sales (por ejemplo, cloruro de sodio), o cualquier combinación de los mismos: Las suspensiones liposomales también se pueden utilizar como vehículos farmacéuticamente aceptables (véase, por ejemplo, EE. UU: Patente N.º 4.522.811): Las preparaciones de las composiciones se pueden formular y envasar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples: Cuando sea necesario (como, por ejemplo, en formulaciones inyectables), se puede mantener la fluidez adecuada mediante, por ejemplo, el uso de un recubrimiento, como lecitina, o un surfactante: la absorción del anticuerpo o de su fragmento de unión al antígeno se puede prolongar incluyendo un agente que retrase la absorción (por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina): Como alternativa, la liberación controlada se puede lograr mediante implantes y sistemas de administración microencapsulados, que pueden incluir polímeros biodegradables y biocompatibles (por ejemplo, acetato de vinilo de etíleno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico; Alza Corporation y Nova Pharmaceutical, Inc.).

Las composiciones que contienen uno o más de cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o conjugados anticuerpo-fármaco descritos en este documento se pueden formular para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraperitoneal) en forma de unidad de dosificación (es decir, unidades físicamente discretas que contienen una cantidad predeterminada de compuesto activo para facilitar la administración y uniformidad de la dosis).

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales (por ejemplo, monos). Se puede determinar la DL50 (dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población): el índice terapéutico es la relación de la DL50:DE50. Se prefieren los agentes que muestran altos índices terapéuticos. Cuando un agente presenta un efecto secundario indeseable, se debe tener cuidado para minimizar el daño potencial (es decir, reducir los efectos secundarios no deseados). La toxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse mediante otros procedimientos farmacéuticos estándar.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios con animales se pueden utilizar para formular una dosis apropiada de cualquier agente determinado para su uso en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). Una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más (p. ej., uno, dos, tres o cuatro) anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en este documento) será una cantidad que trate la enfermedad en un sujeto (p. ej., mate las células cancerosas) en un sujeto (p. ej., un sujeto humano identificado con cáncer), o un sujeto identificado con riesgo de desarrollar la enfermedad (p. ej., un sujeto que previamente desarrolló cáncer pero ahora se ha curado), disminuya la gravedad, frecuencia y/o duración de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto (p. ej., un humano). La eficacia y la dosificación de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento pueden ser determinados por un profesional de la salud o un profesional veterinario utilizando métodos conocidos en la técnica, así como mediante la observación de uno o más síntomas de enfermedad en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). Ciertos factores pueden influir en la dosis y el momento necesarios para tratar eficazmente a un sujeto (por ejemplo, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y la presencia de otras enfermedades).

Las dosis ejemplares incluyen cantidades de miligramos o microgramos de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, o conjugados anticuerpo-fármaco descritos en este documento por kilogramo de peso del sujeto (por

ejemplo, aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 500 mg/kg ; aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 50 mg/kg ; aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 0,5 mg/kg ; o aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Si bien estas dosis cubren un amplio rango, una persona con conocimientos ordinarios en la técnica entenderá que los agentes terapéuticos, incluidos los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos, varían en su potencia y las cantidades efectivas se pueden determinar mediante métodos conocidos en la técnica. Por lo general, al principio se administran dosis relativamente bajas y, posteriormente, el profesional sanitario o veterinario tratante (en el caso de aplicación terapéutica) o un investigador (cuando todavía se trabaja en la fase de desarrollo) pueden aumentar gradualmente la dosis hasta obtener una respuesta adecuada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la vida media del anticuerpo o fragmento de anticuerpo in vivo.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración. La divulgación también proporciona métodos para fabricar los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o conjugados anticuerpo-fármaco para diversos usos como se describe en este documento.

EJEMPLOS

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Métodos y materiales

Se utilizaron los siguientes ensayos en los ejemplos.

Ensayo de unión

- a) Dispense 5×10^5 células en 50 μL de medio en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.
- b) Añadir 100 μL de anticuerpos en diferentes diluciones en los pocillos.
- c) Incubar la placa a temperatura ambiente (TA) durante 60 min.
- d) Centrifugar las células y lavarlas 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 0,1 de albúmina de suero bovino (BSA).
- e) Resuspender el pellet celular en 100 μL de PBS con 0,1 % de BSA que contenga 1:500 de IgG de cabra anti-humana conjugada con Cy3.
- f) Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- g) Lavar las células 3 veces y resuspenderlas en tampón de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).
- h) Analizar las células en el citómetro de flujo.

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

- a) Las células objetivo se lavan con PBS una vez antes del marcaje con calceína AM.
- b) Utilizar una solución madre de calceína AM 1:333 de 2,5 mM para marcar las células objetivo.
- c) Incubar las células a 37°C durante 30 minutos protegiéndolas de la luz.
- d) Lavar las células con PBS tres veces.
- e) Dispensar 50 μL de células diana marcadas con Calceína AM en cada pocillo.
- f) Agregar 100 μL de anticuerpos diluidos en los pocillos.
- g) Incubar la placa a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- h) Añadir 5×10^4 de PBMS (células de efecto) en 50 μL de medio en cada pocillo (la relación E/T es 5).
- i) Incubar la placa a 37°C durante 4 horas.
- j) Centrifugue las células, transfiera 180 μL de sobrenadante a otra placa de 96 pocillos con fondo translúcido y paredes negras.
- k) Leer la placa en una longitud de onda de 485 de excitación y 520 de emisión.

Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

- a) Las células diana se recolectaron y se tiñeron con calceína AM como ADCC (solo para el ensayo de liberación de calceína).
- b) Se sembraron 50 μL de células diana (células 1×10^5) en el pocillo de una placa de 96 pocillos.
- c) Se agregaron 100 μL de anticuerpo en los pocillos en diferentes concentraciones.
- d) Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 min.
- e) Se agregaron 50 μL de suero humano enriquecido con complemento al 10 % a cada pocillo (5 % final).
- f) Incubar la placa a temperatura ambiente durante 45 min.
- g) Transfiera 180 μL de sobrenadante a otra placa de 96 pocillos con fondo translúcido y paredes negras. (Sólo para ensayo de liberación de calceína).
- h) Lavar las células con PBS con 0,1 % de BSA tres veces.

i) Tinción de células con 2 μ L de 7-aminoactinomicina D (7AAD) por pocillo a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad.

j) Lavar las células tres veces y analizarlas en un citómetro de flujo.

5 *Activación de células T*

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) preactivadas en algunos experimentos de ADCC.

10 a) Se utilizan Dynabeads (activador T humano CD3/CD28) para activar PBMC.

b) Después del lavado con tampón, se añaden Dynabeads en PBMC en una proporción de 1:1 junto con 30 U/mL de interleucina-2 (IL2).

c) La mezcla de células se incuba durante un período de tiempo suficiente.

d) Al final de la incubación, las perlas se retiran con un imán y luego las PBMC activadas se utilizan para el ensayo ADCC.

15 *Ensayo de unión celular que involucra células MDA231*

a) Las células MDA231 se preparan en un medio a una concentración de 1×10^6 células/mL.

b) Diluir la muestra de anticuerpos a una concentración adecuada.

c) Transfiera 50 μ L de células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en V.

20 d) Transfiera 50 μ L de anticuerpos a los pocillos de una placa de fondo en V de 96 pocillos.

e) Incubar la mezcla de células durante 60 minutos a temperatura ambiente.

f) Centrifugar las células y lavarlas dos veces con tampón FACS.

g) Resuspender las células en 100 μ L de tampón FACS que contenga IgG de cabra anti-humano (GAH) conjugado con Cy3 (1:500) en cada pocillo.

25 h) Incubar a temperatura ambiente durante 30 min y lavar con tampón FACS x 2.

i) Análisis FACS.

Ensayo de internalización que involucra células MDA231 y SIHA

30 a) Agregue 50 μ L de suspensión celular (células MDA231 o SIHA) a 1×10^6 /m en cada pocillo de la placa de 96.

b) Añadir 50 μ L de Ab en el pocillo correspondiente.

c) Incubar a 37°C durante 30 min.

d) Agregar 100 μ L de IgG GAH marcada con pHrodo Red en cada pocillo e incubar a 37°C durante 24 horas.

e) Tripsinizar y recolectar las células, lavar dos veces y luego ejecutar FACS.

35 *Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) con células MDA231*

a) Células diana: Las células MDA231 se lavaron con PBS dos veces y luego se ajustaron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ /ml en PBS.

40 b) Sembrar células en una placa de 24 pocillos de fondo plano, 300 μ L/pocillo.

c) Añadir 300 μ L de anticuerpos de 20 μ g/mL a los pocillos correspondientes para obtener una concentración final de 10 μ g/mL.

d) Incubar la placa a 37°C durante 48 horas.

e) Al final de la incubación, tripsinizar las células y lavar dos veces con medio simple.

f) Resuspenda los pellets de células en 100 μ L de medio simple y transfiera las células a una placa de 96 pocillos.

45 g) Añadir 100 μ L de suero enriquecido con complemento al 10 % en cada pocillo.

h) Incubar las células durante 4 horas a 37°C.

i) Lave las células dos veces con tampón FACS.

j) Separar las células añadiendo 100 μ L de tripsina durante 3 min.

50 k) Resuspender los pellets de células en tampón FACS que contenga 7AAD (dilución 1:50). 1) Lavar las células dos veces después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.

m) Ejecutar análisis FACS.

EJEMPLO 2: Un anticuerpo biespecífico que se une a CD20 y CD3

55

Se diseñó un anticuerpo biespecífico para unirse a CD20 y CD3. Este anticuerpo biespecífico tiene dos cadenas ligeras comunes (con secuencia idéntica) y dos cadenas pesadas diferentes. A continuación, se muestran las secuencias de las regiones variables de las dos cadenas pesadas y la cadena ligera común.

60 **VH para CD20 (diseñado a partir de la VH de Rituximab):**

QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST
AYMQLSSLrSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVSA (SEQ ID NO: 1)

VH para CD3 (diseñado a partir de la VH de MAb 12F6):

65 EVQLQESGAEELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDKATLTADKSSSTA
YMEISSLTSEDSAVYYCARWQDYDVFYWGEGTTLVSS (SEQ ID NO: 2)

VL común (VL de Rituximab)

QIVLSQSPAIALSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 3)

5

El anticuerpo 12F6 se describe, por ejemplo, en Construcción y caracterización de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-humano CD3 12F6 con funciones de inmunoregulación efectivas, Inmunología, 116 (4), 487-498 (2005). Las secuencias de los anticuerpos parentales también se muestran a continuación con fines comparativos:

10

CD20VH parental (Rituximab VH):

QVQLQQPGAEVKGASVAKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQFKKGATLTADKSSST
AYMQLSSLTSEDSA VYYCARSTYYGGDWYFNWGAG TTGAGA (SEQ ID NO: 8)

15

CD20VL parental (Rituximab):

QIVLSQSPAIALSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAED
AATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 9)

20

CD3VH parental (MAb 12F6 VH):

QVQLQQSGAELARPGASVAKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSSGYTKYNQFKKDATLTADKSSST
AYMQLSSLTSEDSA VYYCARWQDYDVFYWGQGTL TVSS (SEQ ID NO: 10)

25

CD3VL parental (MAb 12F6 VL):

QIVLSQSPAIALSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAED
DAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLETKR (SEQ ID NO: 11)

Las secuencias de CDR para el VH y VL rediseñados también se resumen en las tablas a continuación:

Tabla 1. VHa para CD20 cadena pesada

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
Kabat	SYNMH (SEQ ID NO: 16)	AIYPNGDTSYNQFKKG (SEQ ID NO: 17)	STYYGGDWYFNV (SEQ ID NO: 18)
Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO: 19)	YPGNGD (SEQ ID NO: 20)	STYYGGDWYFNV (SEQ ID NO: 21)

Tabla 2. VHb para cadena pesada CD3

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
Kabat	SYTMH (SEQ ID NO: 22)	YINPSSGYTKYNQFKD (SEQ ID NO: 23)	WQDYDVFYFDY (SEQ ID NO: 24)
Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO: 25)	NPSSGY (SEQ ID NO: 26)	WQDYDVFYFDY (SEQ ID NO: 27)

45

Tabla 3. VL para cadena ligera común

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
Kabat	RASSSVSYIH (SEQ ID NO: 28)	ATSNLAS (SEQ ID NO: 29)	QQWTSNPPT (SEQ ID NO: 30)
Chothia	RASSSVSYIH (SEQ ID NO: 31)	ATSNLAS (SEQ ID NO: 32)	QQWTSNPPT (SEQ ID NO: 33)

El punto isoelectrónico (PI) 3D (tridimensional) para Rituximab Fv (VH+VL) es 9,9 y el PI 3D para 12F6 Fv es 9,8. Después de rediseñar las secuencias, el PI 3D para VHa + VL común es 10,0 y el PI 3D para VHb + VL común es 9,1. El cambio de PI no afecta la afinidad de unión a CD20, y la segunda región de unión al antígeno aún mantiene una afinidad de unión razonable a CD3. Las mutaciones en las dos cadenas VH se muestran en las tablas siguientes.

Tabla 4. Aminoácidos modificados en VH (CD20)

	Numeración de Kabat	Aminoácido en parental	Aminoácido después de la modificación
60	83	T	R

65

Tabla 5. Aminoácidos modificados en VH (CD3)

Numeración de Kabat	Aminoácido en parental	Aminoácido después de la modificación
1	Q	E
6	Q	E
43	Q	E
81	Q	E
105	Q	E

- 10 En las **FIGS. 1A y 1B**, se probaron la capacidad de unión al antígeno de Rituximab rediseñado (anticuerpo A) y 12F6 rediseñado (anticuerpo B) respectivamente. La **FIG. 1A** muestra que el Rituximab rediseñado (anticuerpo A) se une a las células Raji CD20 positivas. El anticuerpo A es un homodímero con dos VH_A (SEQ ID NO: 1) y dos VL comunes (SEQ ID NO: 3). La **FIG. 1B** muestra que el 12F6 rediseñado (anticuerpo B) se une a las células Jurkat CD3 positivas. El anticuerpo Bis también es un homodímero con dos VH_B (SEQ ID NO: 2) y dos VL comunes (SEQ ID NO: 3). Estos datos sugieren que la cadena pesada de Rituximab rediseñada, la cadena pesada 12F6 rediseñada y la cadena ligera común se pueden combinar en un anticuerpo biespecífico funcional, por ejemplo, a través de la tecnología de "perilla en agujero".

15 De este modo, se diseñó un "anticuerpo biespecífico desequilibrado" CD20/CD3. También se introdujeron mutaciones de perilla y agujero en las regiones constantes de la cadena pesada para facilitar la formación del anticuerpo biespecífico.

20 La secuencia de longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera se muestran a continuación:

Longitud completa para la versión 1 de la cadena pesada CD20 (IgG1 Fc de tipo salvaje):

25 QVQLQQPGAEVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQFKFKGATLTADKSSST
AYMQLSSLRSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)

30 **Longitud completa para la cadena pesada CD20 versión 2 (IgG1 Fc con mutación Y407T (agujero)):**

35 QVQLQQPGAEVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQFKFKGATLTADKSSST
AYMQLSSLRSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35)

40 **Longitud completa para la versión 3 de la cadena pesada CD20 (IgG1 Fc con mutación T366Y (perilla)):**

45 QVQLQQPGAEVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQFKFKGATLTADKSSST
AYMQLSSLRSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36)

50 **Longitud completa para la cadena pesada CD3 versión 1 (IgG1 Fc de tipo salvaje):**

55 EVQLQESGAEARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLWIGYINPSSGYTKYNQFKFKGATLTADKSSSTA
YMELSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVFYDGYWGEGLTTLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)

60 **Longitud completa para la cadena pesada CD3 versión 2 (IgG1 Fc con mutación T366Y (perilla)):**

65 EVQLQESGAEARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLWIGYINPSSGYTKYNQFKFKGATLTADKSSSTA
YMELSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVFYDGYWGEGLTTLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

70 **Longitud completa para la versión 3 de la cadena pesada CD3 (IgG1 Fc con mutación Y407T (agujero)):**

75 EVQLQESGAEARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLWIGYINPSSGYTKYNQFKFKGATLTADKSSSTA
YMELSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVFYDGYWGEGLTTLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG

GPSVFLPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

- 5 **Longitud completa para la cadena ligera común:**
QIVLSQSPAIALSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAED
AATYYCQQWTSNPPTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 40)
- 10 La cadena pesada de IgG1 para CD20 con una mutación Y407T (numeración EU) (versión 2; SEQ ID NO: 35), y la cadena pesada de IgG1 para CD3 tiene una mutación T366Y (numeración EU) (versión 2; SEQ ID NO: 38) fueron seleccionadas para elaborar el anticuerpo biespecífico para experimentos posteriores. Este anticuerpo biespecífico también tiene dos cadenas ligeras comunes (SEQ ID NO: 40).
- 15 Este anticuerpo biespecífico desequilibrado también incluye las siguientes características: (1) la afinidad de unión de CD3 se redujo significativamente para aumentar la seguridad; (2) las funciones efectoras ADCC/CDC se mantuvieron para ampliar la implementación clínica; (3) las características bioquímicas y biofísicas del brazo de unión de CD20 y del brazo de unión de CD3 se diferenciaron para permitir un mejor aislamiento del anticuerpo biespecífico durante el proceso de purificación posterior.
- 20 Como se muestra en los siguientes ejemplos, este anticuerpo tuvo una mejor eficacia en la eliminación de células CD20+ Raji que la del homodímero CD20 y Rituximab en presencia de PBMC humanas. Mientras tanto, este anticuerpo no logró matar las células Jurkat CD3+ ni agotar las células T normales en las mismas condiciones. Por lo tanto, este anticuerpo ilustra aplicaciones clínicas prometedoras más amplias que las terapias actuales contra el cáncer anti-CD20: 1) en comparación con Rituximab, este anticuerpo tiene una función de reclutamiento de células T; 2) en comparación con CAR-TI y otras terapias de reclutamiento de células T, este anticuerpo mantiene una función efectora funcional; 3) este anticuerpo no muestra ningún problema de seguridad in vitro. En conjunto, el anticuerpo biespecífico CD20/CD3 y la plataforma descrita en esta divulgación pueden abordar las necesidades no satisfechas en el campo de las terapias dirigidas contra el cáncer.
- 25
- 30 Los anticuerpos biespecíficos descritos en este documento se purificaron a través de dos pasos: purificación por afinidad usando proteína A (Ronda 1) y purificación por intercambio aniónico usando monoQ5/50 (Ronda 2). En la segunda ronda, se utilizó un tampón de pH gradiente (por ejemplo, PBS) para eluir los anticuerpos. Se realizó un ensayo de activación de células T para evaluar diferentes fracciones después de la elución. En la FIG. 20, los números indican diferentes fracciones. Solo los anticuerpos biespecíficos CD20/CD3 pueden activar las células T, por lo tanto, el ensayo de activación de células T puede evaluar la pureza y el contenido de anticuerpos biespecíficos CD20/CD3 en cada fracción. Los resultados indicaron que las fracciones 4 a 7 tenían anticuerpos biespecíficos CD20/CD3 relativamente puros y demostraron que los anticuerpos biespecíficos CD20/CD3 pueden purificarse mediante los métodos descritos en este documento.
- 35
- 40 Además, también se han determinado los PI para los anticuerpos descritos en este documento. Esta información puede ser útil para seleccionar el pH apropiado para la elución.

Tabla 6

	PI
CD20/CD3 BsAb versión 1	8,48
Homodímero CD20 versión 1	8,72
Homodímero CD3 versión 1	8,09
CD20/CD3 BsAb versión 2	8,48
Homodímero CD20 versión 2	8,73
Homodímero CD3 versión 2	8,09
CD20/CD3 BsAb versión 3	8,48
Homodímero CD20 versión 3	8,72
Homodímero CD3 versión 3	8,09
Ab parental CD20	8,66
Ab parental CD3	8,59

60 **EJEMPLO 3: Afinidades de unión para el anticuerpo biespecífico**

Después del diseño computacional, el homodímero CD20 IgG que contiene la secuencia VH diseñada (SEQ ID NO: 1) y la secuencia VL común (SEQ ID NO: 3) mostró una capacidad de unión similar para CD20 en comparación con la del anti-CD20 IgG parental (CD20 parental). El ensayo de afinidad de unión celular se realizó con células Raji (que expresan CD20). Los resultados de la unión se muestran en la FIG. 2A.

El homodímero CD3 IgG que contiene la secuencia VH diseñada (SEQ ID NO: 2) y la secuencia VL común (SEQ ID NO: 3) tuvo una capacidad de unión reducida para CD3 en comparación con la del anti-CD3 IgG parental (CD3 parental). El ensayo de afinidad de unión celular se realizó con células Jurkat (que expresan CD3). Los resultados de la unión se muestran en la FIG. 2B.

5

EJEMPLO 4: Activación de células T por anticuerpo biespecífico CD20/CD3 desequilibrado

El anticuerpo monoclonal biespecífico CD20/CD3 desequilibrado (BsMab) activó las células T solo en presencia de células tumorales diana. Los siguientes experimentos se realizaron utilizando células Raji como células tumorales diana CD20+, células 293 como células de control CD20- y células Jurkat como modelos de células T para probar si CD20/CD3 BsMab puede activar las células T en presencia de células tumorales diana debido al grupo formado por múltiples BsMabs que se unen tanto a las células T como a las células tumorales diana. Por el contrario, CD20/CD3 BsMab no puede activar las células T en presencia de células de control CD20 debido a la unión débil de un brazo al CD3 en la célula T.

10

15 El siguiente procedimiento experimental se utilizó en este ejemplo:

- 1) Sembrar por separado Raji y Jurkat, Jurkat y 293 1×10^5 en una placa de 96 pocillos con fondo en U.
- 2) Agregue el anticuerpo de prueba e incube durante la noche (19 horas).
- 3) Lave las células una vez con PBS+0,1 %BSA
- 20 4) Agregar anticuerpo anti-CD69 humano (marcado con PE) (1.5 μl/pocillo) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Lave las células una vez.
- 6) Lectura.

25 Los resultados se muestran en la FIG. 3. La potencia de activación de las células T en presencia de células Raji con diferentes concentraciones del anticuerpo de prueba se muestra en la FIG. 4. Se utilizaron anticuerpos de isotipo (anticuerpos IgG1 no específicos) como controles. La activación de las células T se midió mediante la expresión de CD69 en la superficie de las células Jurkat.

EJEMPLO 5: El BsMab CD20/CD3 desequilibrado induce la muerte celular mediada por PBMC

30

El BsMab CD20/CD3 desequilibrado indujo una mejor muerte celular mediada por PBMC que Rituximab y el anticuerpo homodímero CD20 antes y después de la activación de las células T.

35 Activación de células pre-T: Células mononucleares de sangre periférica frescas (PBMC) de un donante sano se sometieron a reposo durante la noche a 37 °C y se incubaron con células Raji CD20+ marcadas con calceína en presencia de diferentes anticuerpos como se indica en la figura durante 4 horas. La tasa de muerte celular se midió mediante la liberación de calceína. Los resultados se muestran en la FIG. 5.

40 Activación posterior a las células T (4 días): Se incubaron PBMC frescas de un donante sano con IL-2 recombinante y perlas CD3/CD28 durante 4 días para activar las células T, seguido de una incubación con células Raji CD20+ marcadas con calceína y diferentes anticuerpos como se indica en la figura durante 2 horas. La tasa de muerte celular se midió mediante la liberación de calceína. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

45 Activación posterior a las células T (7 días): Se incubaron PBMC frescas de un donante sano con IL-2 recombinante y perlas CD3/CD28 durante 7 días para activar las células T, seguido de una incubación con células Raji CD20+ marcadas con calceína y diferentes anticuerpos como se indica en la figura durante 2 horas. La tasa de muerte celular se midió mediante la liberación de calceína. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

50 Para abordar la preocupación de seguridad sobre si los BsMab CD20/CD3 desequilibrados también matan a las células T CD3+ en las mismas condiciones que las indicadas en los ensayos de muerte de PBMC, para cada experimento se utilizaron células Jurkat CD3+ como control. Sólo se probó la concentración más alta de anticuerpos (10 μg/ml). Los resultados de la preactivación de células T se muestran en la FIG. 8. Los resultados posteriores a la activación de las células T (4 días) se muestran en la FIG. 9. Los resultados posteriores a la activación de las células T (7 días) se muestran en la FIG. 10. El número de células Jurkat en el grupo tratado con PBS se estableció como valor inicial. Por tanto, el porcentaje de mortalidad sería cero si el número de células Jurkat fuera equivalente al del grupo tratado con PBS. El porcentaje de muerte sería negativo si el número de células es mayor que el del grupo tratado con PBS.

55 Los resultados mostraron que no se observó muerte de células Jurkat antes de la activación de las células T ni 4 días después de la activación de las células T. Sin embargo, se observó la muerte de Jurkat a los 7 días posteriores a la activación de las células T, condición en la que Rituximab y el IgG homodímero CD20 no indujeron la muerte de las células Raji. Esto sugiere que la muerte de células Jurkat en 7 días puede ser causada por la superactivación de las células T. Para probar más a fondo si las propias células T naturales activadas durante 7 días también morían en presencia de BsMab CD20/CD3 desequilibrado, las mismas PBMC activadas durante 7 días se incubaron con diferentes anticuerpos como se indica en la figura durante la noche y se verificó el estado de agotamiento de las células T. Los resultados se muestran en la FIG. 11. LALA en la figura es el BsMab CD20/CD3 con mutaciones L234A y L235A (numeración UE). El anticuerpo con mutaciones L234A y L235A no tiene función efectora Fc, por lo que se utilizó como control negativo.

EJEMPLO 6: Disminución de células T por anticuerpos CD20/CD3 biespecíficos desequilibrados

También se realizaron experimentos para probar si las células T preactivadas pueden ser disminuidas por anticuerpos BsMab CD20/CD3 desequilibrados.

5 La FIG. 12 muestra que las células T no activadas en PBMC no se agotaron por el BsMab CD20/CD3 desequilibrado después de la incubación durante la noche.

EJEMPLO 7: Inducción de citotoxicidad dependiente del complemento

10 Dado que el BsMab CD20/CD3 tiene un brazo que se une a CD20 con una alta afinidad, se realizaron experimentos para probar si la unión al brazo de CD20 es suficiente para inducir citotoxicidad dependiente del complemento. Los anticuerpos se incubaron con suero enriquecido con complemento humano y células Raji CD20+. El BsMab CD20/CD3 desequilibrado presentó una eficacia de CDC reducida en comparación con Rituximab y el anticuerpo homodímero CD20. Los resultados de detección por FACS (7AAD) se muestran en la FIG. 13. Los resultados de detección por liberación de calceína se muestran en la FIG. 14.

EJEMPLO 8: Evaluación de seguridad

20 También se evaluó si las células Jurkat CD3+ y las células T normales pueden ser destruidas por BsMab CD20/CD3 desequilibrado. La FIG. 15 mostró que una dosis alta de BsMab CD20/CD3 desequilibrado no indujo CDC en células Jurkat.

25 La FIG. 16 muestra que el BsMab CD20/CD3 desequilibrado no indujo la muerte de células T después de la co-incubación con PBMC y suero humano con suero enriquecido con complemento humano.

EJEMPLO 9: El BsMab CD20/CD3 desequilibrado puede matar células Raji resistentes a Rituximab

30 Para probar si el BsMab CD20/CD3 desequilibrado puede matar células Raji resistentes a Rituximab (RRCL), se incubaron RRCL con PBMC activados durante 7 días de tres donantes diferentes en presencia de anticuerpos como se indica en las figuras, se observó una muerte significativa de RRCL en presencia de BsMab CD20/CD3 desequilibrado (FIGS. 17-19).

EJEMPLO 10: Estudios en animales para BsMab CD20/CD3 desequilibrado

35 Se realizaron experimentos para evaluar los efectos de BsMab CD20/CD3 en animales.

40 Se mezclaron células Raji, PBMC humanas y BsMab CD20/CD3 desequilibrado y se inyectaron en ratones mediante administración intravenosa. Estas células Raji fueron marcadas con luciferasa. Cada ratón (B-NDG, Biocytogen, Beijing, Cat# 201811808) del grupo de tratamiento recibió 5×10^5 células Raji, $2,5 \times 10^6$ células PBMC humanas y 60 μ g de anticuerpos. Se tomaron imágenes de los ratones para rastrear el agotamiento de células Raji el día 0, el día 2, el día 3 y cada tres días después del día 3.

45 El día 0, las células Raji marcadas con luciferasa y las células PBMC humanas se mezclaron con solución salina tamponada con fosfato PBS (grupo G1; control; n = 4), CD20/CD3 BsMab (grupo G2; n = 4) o Rituximab (anticuerpos anti-CD20; grupo G3; n = 4). Se tomaron imágenes de los ratones por primera vez 15 minutos después de la inyección intravenosa (iv), y luego se tomaron imágenes el día 2, el día 3 y cada 3 días después del día 3.

50 La FIG. 21A muestra que el BsMab CD20/CD3 y el Rituximab no tuvieron efectos tóxicos obvios. La FIG. 21B muestra que tanto el BsMab CD20/CD3 como el Rituximab tuvieron efectos inhibidores de tumores, y el Rituximab no fue tan efectivo como el BsMab CD20/CD3. La diferencia en los efectos inhibidores del tumor se observó a partir del día 16 después de la inyección.

EJEMPLO 11: Caracterización de anticuerpos biespecíficos desequilibrados

55 Se realizaron experimentos para caracterizar la muestra de anticuerpo biespecífico CD20/CD3 purificado.

60 En primer lugar, se realizó una electroforesis capilar reductora con dodecil sulfato de sodio (Re-CE-SDS) para la muestra de anticuerpo biespecífico CD20/CD3 purificado. Los resultados mostraron que hubo tres picos principales. Segundo el tamaño molecular, el pico n.º 1 fue la cadena ligera común (CL), los picos n.º 2 y n.º 3 fueron las dos cadenas pesadas (HC) diferentes (FIG. 22A).

65 También se realizó CE no reductora (Non-Re-CE-SDS). Los resultados mostraron que había un pico principal para la IgG biespecífica CD20/CD3 (FIG. 22B). Los resultados de las FIGS. 22A y 22B sugieren que la muestra de anticuerpo biespecífico CD20/CD3 tiene buena pureza.

En segundo lugar, se realizó fluorimetría de barrido diferencial (DSF) para medir la temperatura de fusión de la proteína (Tm) y se realizó dispersión de luz estática (SLS) para medir la temperatura de agregación a 266 nm (Tagg 266) y 473 nm (Tagg 473). La muestra fue enviada al sistema UNcle para su análisis. Se realizó una rampa de temperatura de 1 °C/min con monitoreo de 20 °C a 95 °C para DSF y SLS. El tío mide SLS a 266 nm y 473 nm. Tm y Tagg se calcularon y analizaron utilizando el software de análisis UNcle.

Algunos anticuerpos de prueba tienen dos Tms y otros tienen tres Tms. Esto se debe a que la IgG tiene una estructura multidominio, el dominio CH2 normalmente tiene una Tm de -70 °C en PBS y el CH3 es más estable, su Tm es de aproximadamente 80 °C. Los Fab tienen Tm en un amplio rango, alrededor de 50-85 °C, debido a su gran variación de secuencia. Por lo tanto, el valor de Tm medido mediante diversas técnicas analíticas suele ser la temperatura de transición "aparente" en lugar de la temperatura de fusión formal. En el caso del anticuerpo IgG completo, a menudo hay 2-3 valores de Tm en la medición de DSF. No es fácil determinar qué Tm representa qué dominio.

En el caso de este anticuerpo biespecífico, es probable que la Tm de 86,7 °C represente solo el dominio CH3. Los otros 1 o 2 Tms inferiores representan Fab, CH2 o Fab+CH2.

En cuanto a Tagg, es la temperatura a la que SLS comienza a detectar agregación. Tagg266 mide SLS a 266 nm, lo que es más sensible y adecuado para detectar partículas más pequeñas. Tagg473 mide a 473 nm y es mejor para detectar partículas más grandes.

Tanto los datos de DSF como de SLS muestran que el anticuerpo biespecífico CD20/CD3 tiene buena termoestabilidad.

Tabla 7

25	DSF			SLS	
	Tm D1	Tm D2	Tm D3	Tagg266	Tagg473
	Temperatura °C	66,0	80,1	86,7	70,9 71,2

En tercer lugar, la dispersión de luz dinámica (DLS) solo detectó partículas moleculares de un tamaño (10,15 nm). Los 30 resultados indicaron que no hubo agregación en la muestra.

Tabla 8

DLS	Pico N.º	Diámetro de modo (nm)	Masa (%)	PDI
20 °C	Pico 1	10,15	100	0,177
	Pico 2	n.a.		
	Pico 3	n.a.		

40 Estos datos de caracterización sugieren que el anticuerpo biespecífico CD20/CD3 tiene buena capacidad de desarrollo como anticuerpo terapéutico.

EJEMPLO 12: Anticuerpos biespecíficos que se unen a PD-L1 y CD55

45 Se diseñaron dos versiones de anticuerpos biespecíficos para unirse a PD-L1 y CD55 (PD-L1/CD55 BsMab v1 y PD-L1/CD55 BsMab v2). Estos anticuerpos biespecíficos tienen dos cadenas ligeras comunes y dos cadenas pesadas diferentes.

50 A continuación, se muestran las secuencias de las regiones variables de las dos cadenas pesadas y la cadena ligera común de la primera versión del anticuerpo biespecífico (PD-L1/CD55 BsMab v1).

VH para PD-L1 (diseñado a partir de Avelumab):

EVQLLESGGGLVPEPGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTA VYYCARIKLGTVTVDYWGEGTLVTV SS (SEQ ID NO: 4)

55 **VH para CD55 (diseñado a partir de CD55 ScFV):**
QVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMWSIRQTPGKRLEWVATINSGGSYTYSDSVKGRFTISRDNVKNTL
YLQMSSLKSEDTAMYYCARRNGTLYYLMDYWGRGT LTVSS (SEQ ID NO: 5)

60 **VL común (diseñado a partir de CD55 ScFV):**

QSALTQPAVSQGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNVYVSWYQQHPGKAPKLMIVDYSKRPSG
VSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSASTRIFGGGTKVTVLR (SEQ ID

65 NO: 6)

El CD55 ScFv se describe, por ejemplo, en Identificación de un Fv de cadena única anti-CD55 humano mediante selección sustractiva de una biblioteca de fagos utilizando líneas celulares tumorales y no tumorales, Cancer Res. 59 (11), 2718-2723 (1999). Las secuencias de los anticuerpos parentales también se muestran a continuación con fines comparativos:

- 5 **VH PD-L1 parental:**
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 12)
- 10 **VL PD-L1 parental:**
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISG
LQAEDEADEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTL (SEQ ID NO: 13)
- 15 **VH CD55 parental:**
QVKLQESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMWSIRQTPDKRLEWVATINSGGSYTYYSDSVKGRFTISRDNVKNTL
YLQMSSLKSEDTAMYYCARRNGTLYYLMWDYWGRTLTVSS (SEQ ID NO: 14)
- 20 **CD55 VL parental:**
QSVLTQPPSASGSPGQSITISCTGTSSDVGGNYVSWYQQHPGKAPKFMYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISG
VQAEDEADEADYYCSSYTSASTVIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 15)
- 25 El PI 3D para Avelumab Fv (VH+VL) es 9,4 y el PI 3D para anti-CD55 Fv es 9,8. Después de rediseñar las secuencias, el PI 3D para VHa + VL común es 9,9 y el PI 3D para VHb + VL común es 9,3. Las mutaciones de las dos cadenas VH se muestran en las tablas siguientes.

25 **Tabla 9. Aminoácidos modificados en VH (PD-L1)**

Numeración de Kabat	Aminoácido en parental	Aminoácido después de la modificación
13	Q	E
105	Q	E

30 **Tabla 10. Aminoácidos modificados en VH (CD55)**

Numeración de Kabat	Aminoácido en parental	Aminoácido después de la modificación
13	Q	K
42	D	G

EJEMPLO 13: Afinidades de unión para los anticuerpos PD-L1 y CD55 de nuevo diseño

Se realizaron experimentos para determinar las afinidades de unión para los anticuerpos PD-L1 y CD55 de nuevo diseño.

40 El anticuerpo anti-homodímero PD-L1 IgG (PD-L1 v1) que contiene la secuencia VH diseñada (SEQ ID NO: 4) y la secuencia VL común (SEQ ID NO: 6) tuvo una afinidad de unión más débil que el anticuerpo anti-PD-L1 parental (PD-L1 wt) (FIG. 23A). El IgG homodímero anti-CD55 (CD55 v1) que contiene la secuencia VH diseñada (SEQ ID NO: 5) y la secuencia VL común (SEQ ID NO: 6) tuvo una afinidad de unión similar en comparación con el anticuerpo anti-CD55 parental (CD55 wt) (FIG. 23B).

45 Debido a que el anticuerpo biespecífico debe unirse al antígeno específico del cáncer (PD-L1) con alta afinidad, y el otro brazo del anticuerpo biespecífico debe unirse al antígeno asociado al cáncer (CD55) con baja afinidad, los anticuerpos (CD55 v1 y PD-L1 v1) no cumplieron con este requisito.

50 Por lo tanto, se diseñó una segunda versión del anticuerpo biespecífico para unirse a PD-L1 y CD55 (PD-L1/CD55 BsMab v2). El VHa y el VHb de la segunda versión del anticuerpo biespecífico son idénticos al VHa y el VHb de la primera versión del anticuerpo biespecífico. Sin embargo, la cadena ligera común se rediseñó según los métodos descritos en este documento. La secuencia para la cadena ligera común rediseñada se muestra a continuación:

- 55 **VL2 común (rediseñado a partir de SEQ ID NO: 6):**
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISG
LQAEDEADEADYYCSSYTSASTRIFGGGTKLTVLR (SEQ ID NO: 7)
- 60 La alineación para VL común (SEQ ID NO: 6) y VL2 común (SEQ ID NO: 7) se muestra en la FIG. 24. La secuencia subrayada es la secuencia de la región constante de la cadena ligera.

Las secuencias CDR de estos VH y VL rediseñados se muestran a continuación:

Tabla 11. VH_a para la cadena pesada de PD-L1

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	
5	Kabat	SYIMM (SEQ ID NO: 41)	SIYPSGGITFYADTVKG (SEQ ID NO: 42)	IKLGTVTVDY (SEQ ID NO: 43)
	Chothia	GFTFSSY (SEQ ID NO: 44)	YPSGGI (SEQ ID NO: 45)	IKLGTVTVDY (SEQ ID NO: 46)

Tabla 12. VH_b para cadena pesada CD55

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	
10	Kabat	GYGMS (SEQ ID NO: 47)	TINSGGSYTYYSDSVKG (SEQ ID NO: 48)	RNGTLYYYLMDY (SEQ ID NO: 49)
15	Chothia	GFTFSGY (SEQ ID NO: 50)	NSGGSY (SEQ ID NO: 51)	RNGTLYYYLMDY (SEQ ID NO: 52)

Tabla 13. Versión 1 de VL para el VL común

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	
20	Kabat	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 53)	DVSKRPS (SEQ ID NO: 54)	SSYTSASTRI (SEQ ID NO: 55)
	Chothia	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 56)	DVSKRPS (SEQ ID NO: 57)	SSYTSASTRI (SEQ ID NO: 58)

Tabla 14. Versión 2 de VL para el VL común

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	
25	Kabat	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 59)	DVSNRPS (SEQ ID NO: 60)	SSYTSSSTRI (SEQ ID NO: 61)
30	Chothia	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 62)	DVSNRPS (SEQ ID NO: 63)	SSYTSSSTRI (SEQ ID NO: 64)

Además, debido a que las cadenas ligeras lambda son menos comunes en comparación con las cadenas ligeras kappa en el suero humano, la región constante de la cadena ligera lambda se reemplazó por la región constante de la cadena ligera kappa en los ejemplos.

Se realizaron experimentos para determinar las afinidades de unión de la segunda versión de anticuerpos. El homodímero IgG anti-PD-L1 (PD-L1 v2) que contiene la secuencia VH diseñada (SEQ ID NO: 4) y la secuencia VL2 común (SEQ ID NO: 7) tuvo una afinidad de unión similar en comparación con el anticuerpo anti-PD-L1 parental (PD-L1 wt) (FIG. 25A). El anticuerpo anti-homodímero CD55 IgG (CD55 v2) que contiene la secuencia VH diseñada (SEQ ID NO: 5) y la secuencia VL2 común (SEQ ID NO: 7) tuvo una afinidad de unión más débil en comparación con el anticuerpo anti-CD55 parental (CD55 wt) (FIG. 25B). Por lo tanto, las afinidades de unión de los anticuerpos con las secuencias rediseñadas cumplen con los requisitos y se seleccionó PD-L1/CD55 BsMab v2 para experimentos adicionales. El PD-L1/CD55 BsMab v2 tiene dos cadenas ligeras comunes (cadena kappa) que comprenden SEQ ID NO: 7, una cadena pesada IgG1 que comprende SEQ ID NO: 4 y una cadena pesada IgG1 que comprende SEQ ID NO: 5. Además, la cadena pesada de PD-L1 tiene la mutación Y407T (numeración EU), y la cadena pesada de IgG1 para CD55 tiene una mutación T366Y (numeración EU).

La secuencia de longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera se muestran a continuación:

50 Longitud completa para la cadena pesada PD-L1:

EVQLLESGGGLEVPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGEGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 65)

60 Longitud completa para la cadena pesada CD55:

QVKLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMWSIRQTPGKRLEWVATINSGGSYTYYSDSVKGRFTISRDNVKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARRNGTLYYYLMDYWGRGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)

65 Longitud completa para la cadena ligera común CD55 versión 1:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPGVSNRFGSKSGNTASLTISG
LQAEDeadYYCSSYTSASTRIFGGGTKTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQG
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 67)

- 5 **Longitud completa para la cadena ligera común CD55 versión 2:**
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPGVSNRFGSKSGNTASLTISG
LQAEDeadYYCSSYTSASTRIFGGGTKTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQG
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 68)
- 10 Además, también se han determinado los PI para los anticuerpos descritos en este documento. Esta información puede ser útil para seleccionar el pH apropiado para la elución.

Tabla 15

	PI
PDL1/CD55 BsAb versión 1	8,64
PDL1 homodímero versión 1	8,36
CD55 homodímero versión 1	8,83
PDL1/CD55 BsAb versión 2	8,57
PDL1 homodímero versión 2	8,24
CD55 homodímero versión 2	8,78
PDL1 Ab parental	8,36
CD55 Ab parental	8,6

25 **EJEMPLO 14: Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) para anticuerpos biespecíficos PD-L1/CD55**

Se realizaron experimentos para probar la citotoxicidad dependiente del complemento para los anticuerpos biespecíficos PD-L1/CD55. Se incluyeron sus anticuerpos parentales con fines de comparación. Los ensayos se realizaron en células MDA23 I según el protocolo descrito en este documento, y la concentración de cada anticuerpo fue de 10 ug/ml. Los resultados se muestran en las FIGS. 26A- 26B.

30 Como se muestra en las figuras, tanto los anticuerpos parentales anti-PD-L1 (PD-L1 wt) como los anti-CD55 (CD55 wt) 35 pueden inducir CDC. El anticuerpo biespecífico PD-L1/CD55 v1 tuvo una CDC mucho menor en comparación con el anticuerpo anti-PD-L1 parental (PD-L1 wt) y el anticuerpo anti-CD55 parental (CD55 wt). Por el contrario, el anticuerpo biespecífico PD-L1/CD55 v2 tuvo un CDC mucho más alto que la primera versión, el anticuerpo anti-PD-L1 parental (PD-L1 wt) y el anticuerpo anti-CD55 parental (CD55 wt). El efecto CDC del anticuerpo biespecífico PD-L1/CD55 v2 fue aproximadamente 4,5 veces mayor que la eficacia CDC de la primera versión del anticuerpo biespecífico.

40 **EJEMPLO 15: Internalización inducida por anticuerpos biespecíficos PD-L1/CD55**

Se realizaron experimentos para evaluar la internalización inducida por anticuerpos biespecíficos PD-L1/CD55.

45 Se realizaron ensayos de internalización de las dos versiones de los anticuerpos biespecíficos PD-L1/CD55 y sus anticuerpos parentales. Se utilizaron células MDA23 I en el primer experimento de internalización (FIG. 27A) y se utilizaron células SIHA en el segundo experimento de internalización (FIG. 27B). Las células se mezclaron con 20 ug/ml de anticuerpos y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Luego se agregó el anticuerpo secundario marcado con pHrodo y se incubó con las células a 37 °C durante 24 horas. Luego se recolectaron las células y se analizaron mediante FACS.

50 CD55 es un receptor de infección por Echovirus y virus Coxsackie B, del cual se sabe que es un receptor con capacidad de internalización. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal parental anti-CD55 (CD55 wt) puede desencadenar una rápida internalización de CD55. Como se muestra en la FIG. 27A, en las células MDA23 I que tienen un nivel de expresión de PD-L1 y CD55 similar, la internalización desencadenada por el anticuerpo anti-PD-L1 fue mucho más lenta que la de CD55. Sin embargo, tanto el anticuerpo biespecífico PD-L1/CD55 v1 como v2 pueden inducir la internalización, y la tasa 55 de internalización fue comparable a la del anticuerpo monoclonal parental anti-CD55.

60 En la FIG. 27B, la expresión de CD55 es mayor que la de PD-L1 en las células SIHA. Ambos anticuerpos biespecíficos PD-L1/CD55 v1 y v2 pueden inducir una mejor internalización que el anticuerpo anti-PD-L1 parental y el anticuerpo anti-CD55 parental. Sin embargo, dada la unión reducida de PD-L1/CD55 BsMab v2 a CD55 en comparación con la de v1, el PD-L1/CD55 BsMab v2 debería tener un mejor equilibrio eficacia/seguridad in vivo, y debería ser más seguro que el PD-L1/CD55 BsMab v1. Por lo tanto, se espera que PD-L1/CD55 BsMab pueda inducir la muerte de células cancerosas objetivo en tres niveles diferentes: (1) bloquear la interacción PDI/PD-L1; (2) inducir la internalización de PD-L1; 65 (3) cuando se conjuga con un fármaco, el conjugado anticuerpo-fármaco puede matar la célula cancerosa.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión a antígeno que comprende:
 - 5 una primera región variable de cadena pesada (VH1),
una segunda región variable de cadena pesada (VH2),
una primera región variable de cadena ligera (VL1) y
una segunda región variable de cadena ligera (VL2),
donde VH1 y VL1 se asocian entre sí, formando una primera región de unión a antígeno que se une específicamente a CD20, y VH2 y VL2 se asocian entre sí, formando una segunda región de unión a antígeno que se une específicamente a CD3,
donde VL1 y VL2 son idénticos, y
donde VH1 comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1; VH2 comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 2; VL1 comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 3; y VL2 comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 3.
 - 10
 - 15
2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada que comprende el VH1, una segunda cadena pesada que comprende el VH2, una primera cadena ligera que comprende el VL1 y una segunda cadena ligera que comprende el VL2, en el que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se asocian entre sí mediante la técnica de "perillas en agujeros".
- 20
3. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo biespecífico tiene una región Fc funcional que puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 25
4. Una célula que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1-3.
- 30
5. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, que comprende un primer polipéptido, un segundo polipéptido, un tercer polipéptido y un cuarto polipéptido, en donde el primer polipéptido es una cadena pesada que comprende el VH1, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 34, 35 o 36; el segundo polipéptido es una cadena pesada que comprende el VH2, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 37, 38 o 39; el tercero polipéptido es una cadena ligera que comprende el VL1, en donde el tercero polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 40; y el cuarto polipéptido es una cadena ligera que comprende VL2, en donde el cuarto polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a SEQ ID NO: 40, en donde el primer polipéptido y el tercero polipéptido se asocian entre sí y se unen específicamente a CD20, y en donde el segundo polipéptido y el cuarto polipéptido se asocian entre sí y se unen específicamente a CD3.
- 35
- 40
6. Una composición que comprende el anticuerpo biespecífico o su fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto.
- 45
7. La composición para uso de la reivindicación 6, en donde el sujeto tiene un tumor sólido, melanoma, carcinoma pancreático, una neoplasia hematológica, linfoma no Hodgkin, linfoma o leucemia linfocítica crónica.

50

55

60

65

Unión a la célula Raji

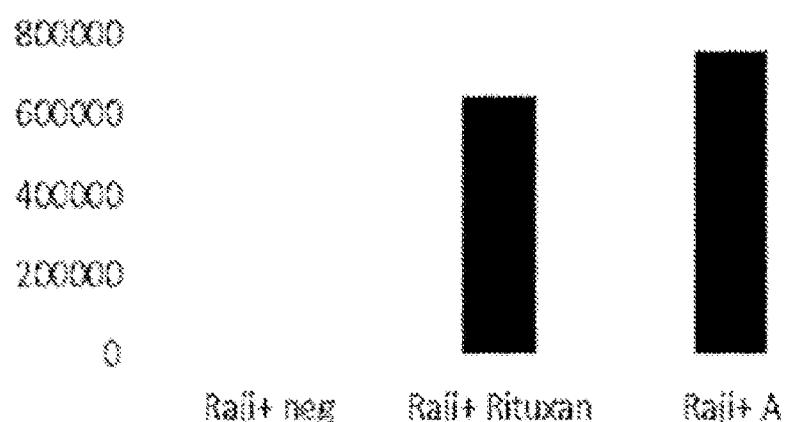


FIG. 1A

Unión a la célula Jukart

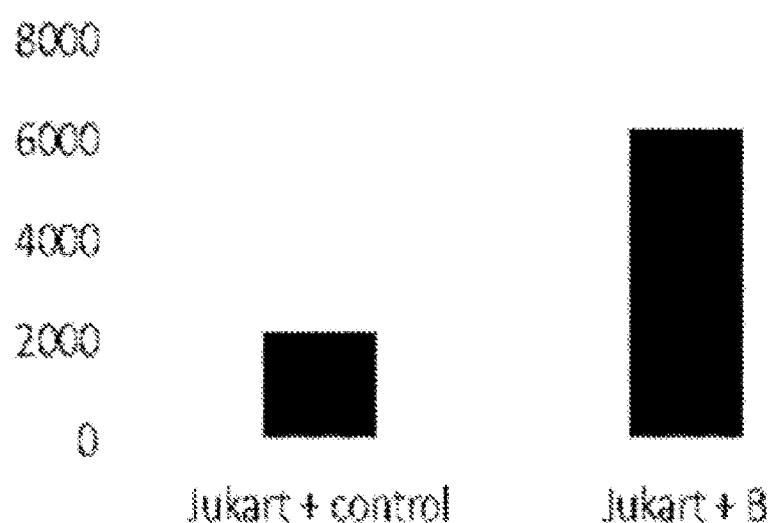


FIG. 1B

Unión de anticuerpos en las células Raji

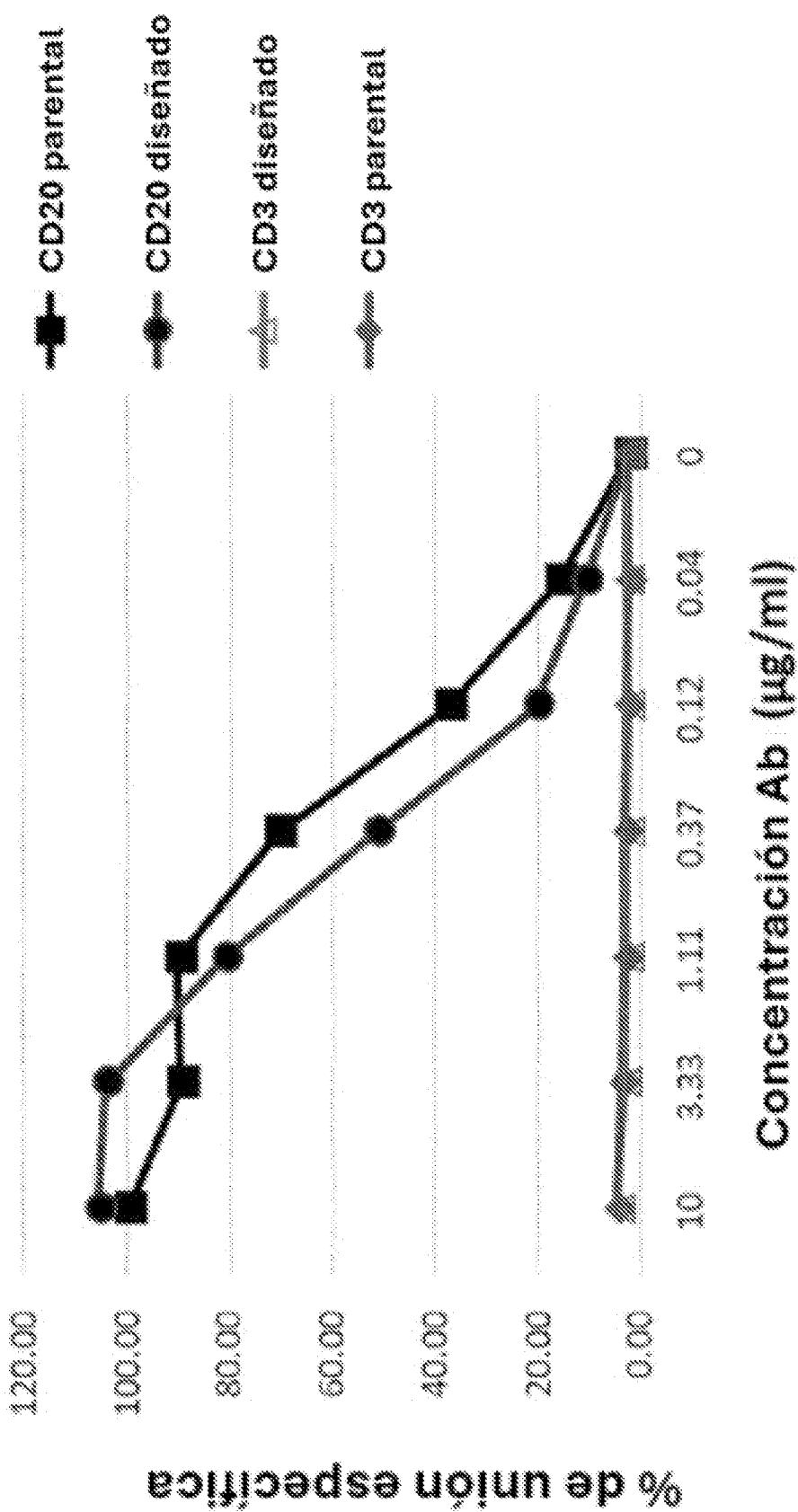


FIG. 2A

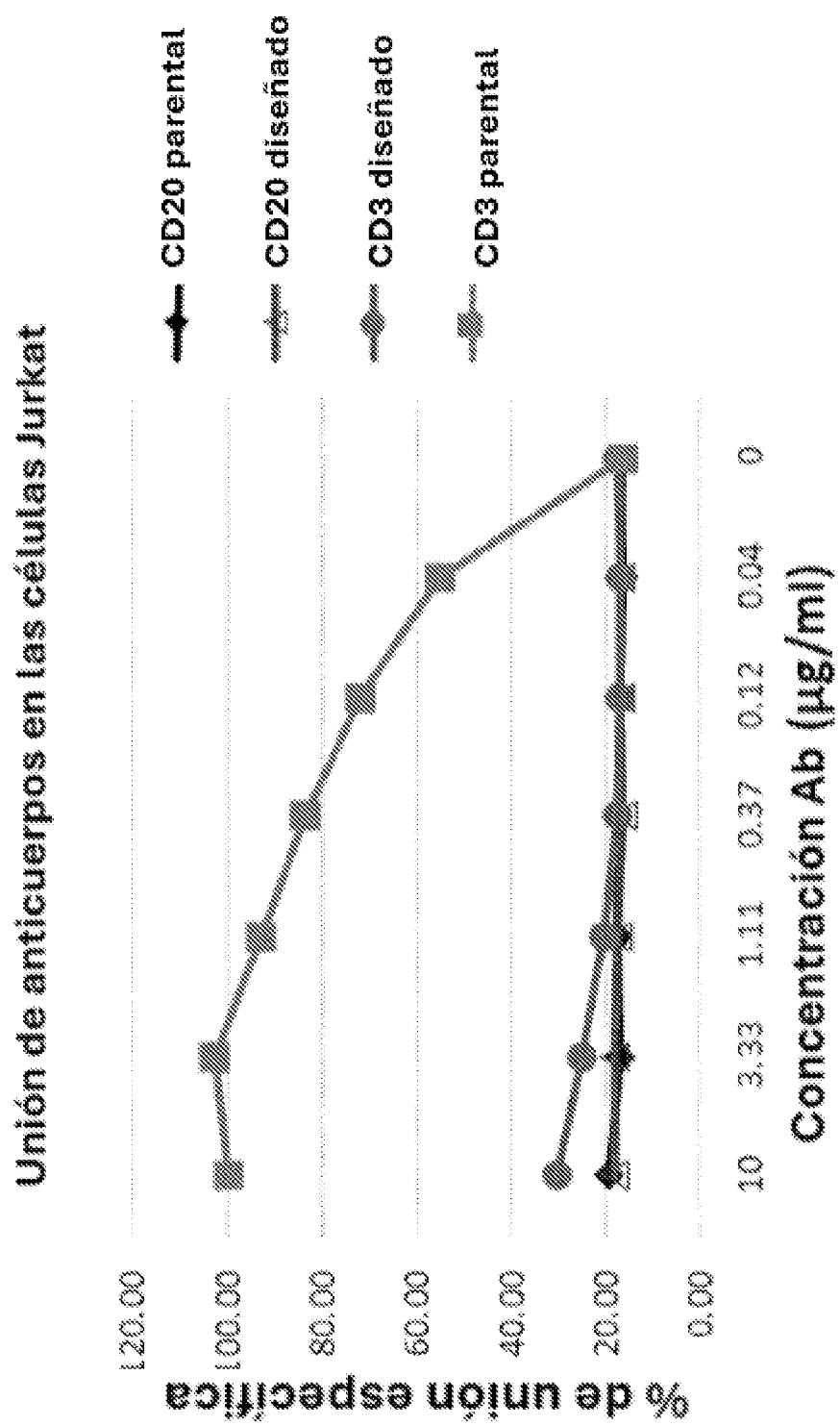


FIG. 2B

Activación de células T

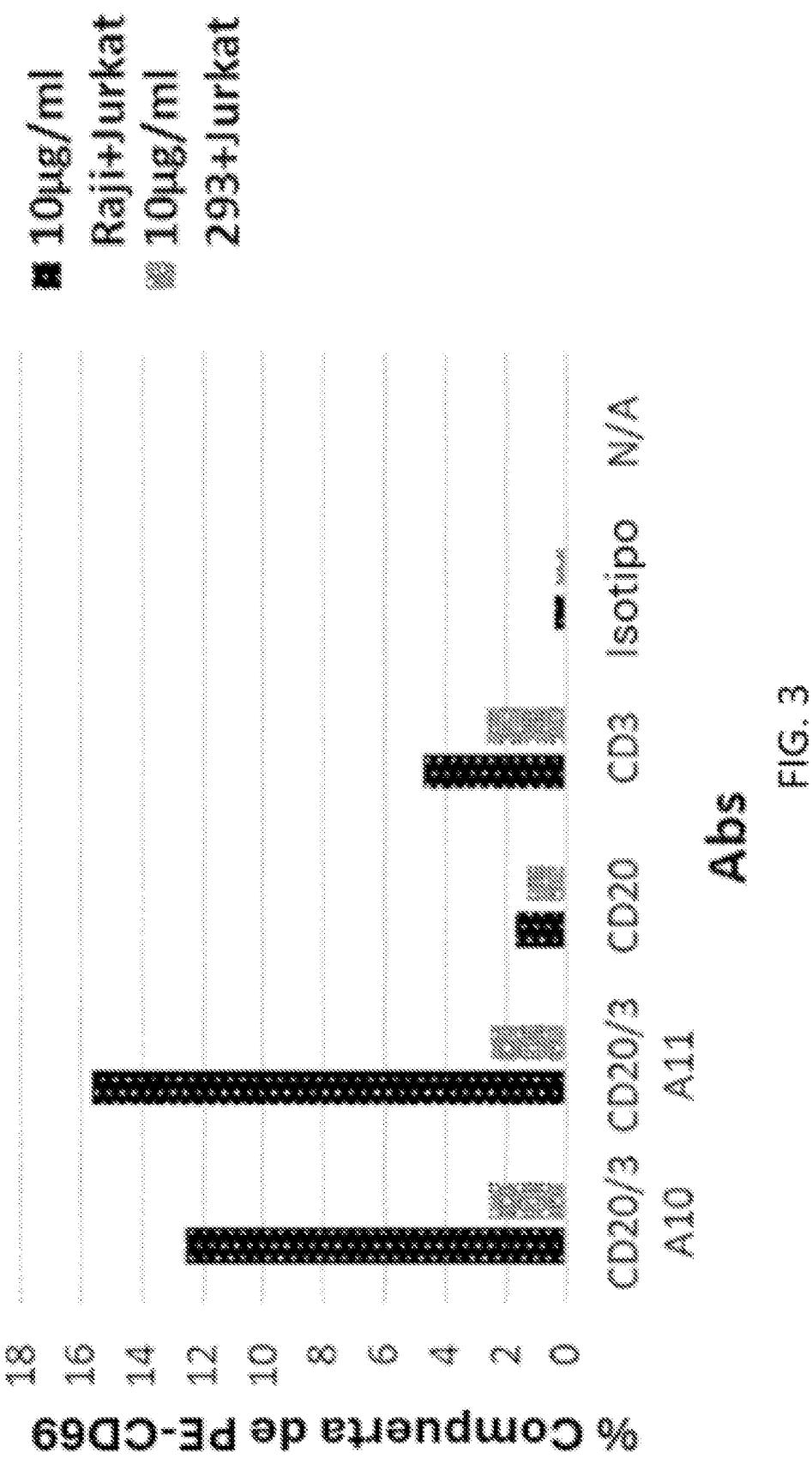


FIG. 3

Activación de células T

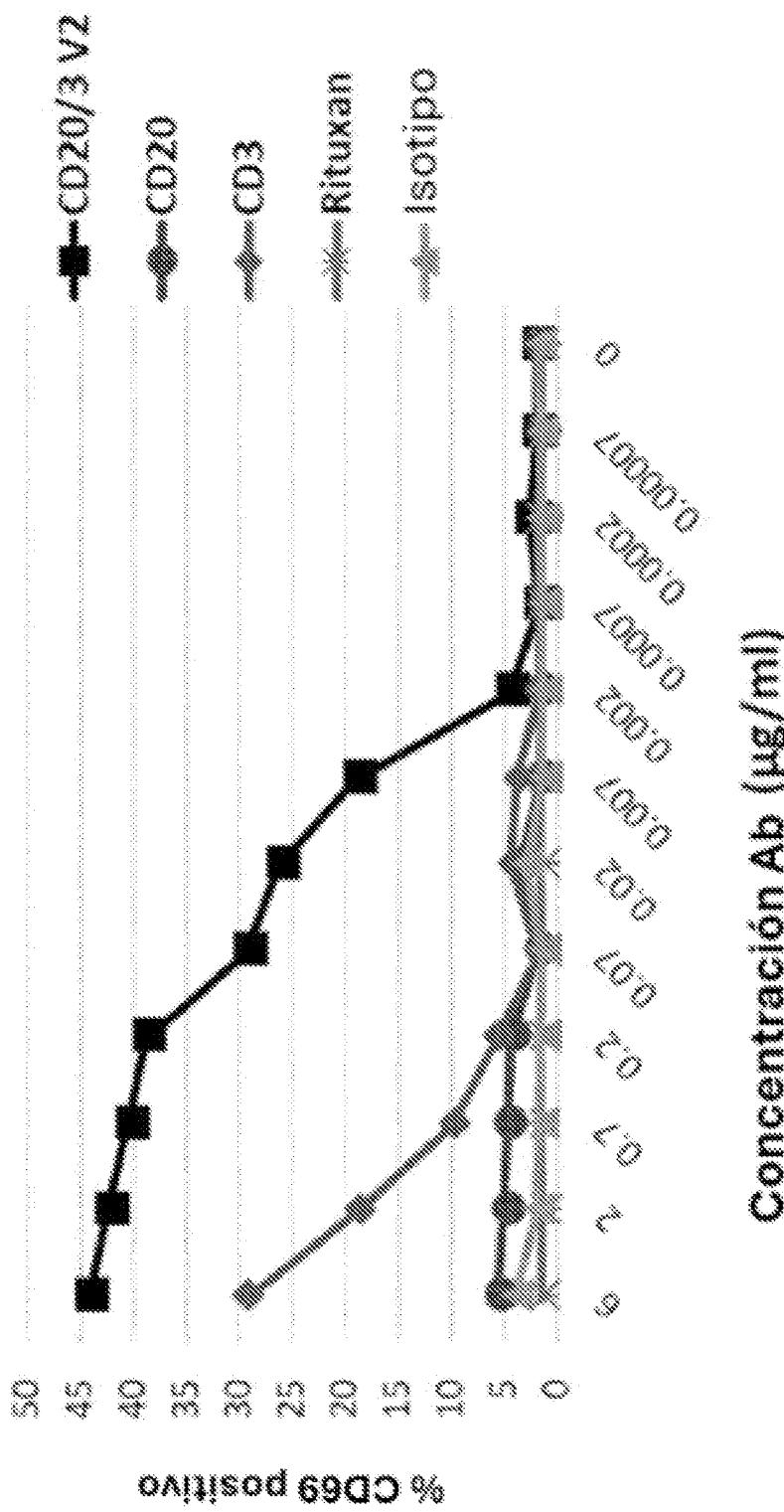


FIG. 4

Lisis ADCC de células Raji mediada por Abs

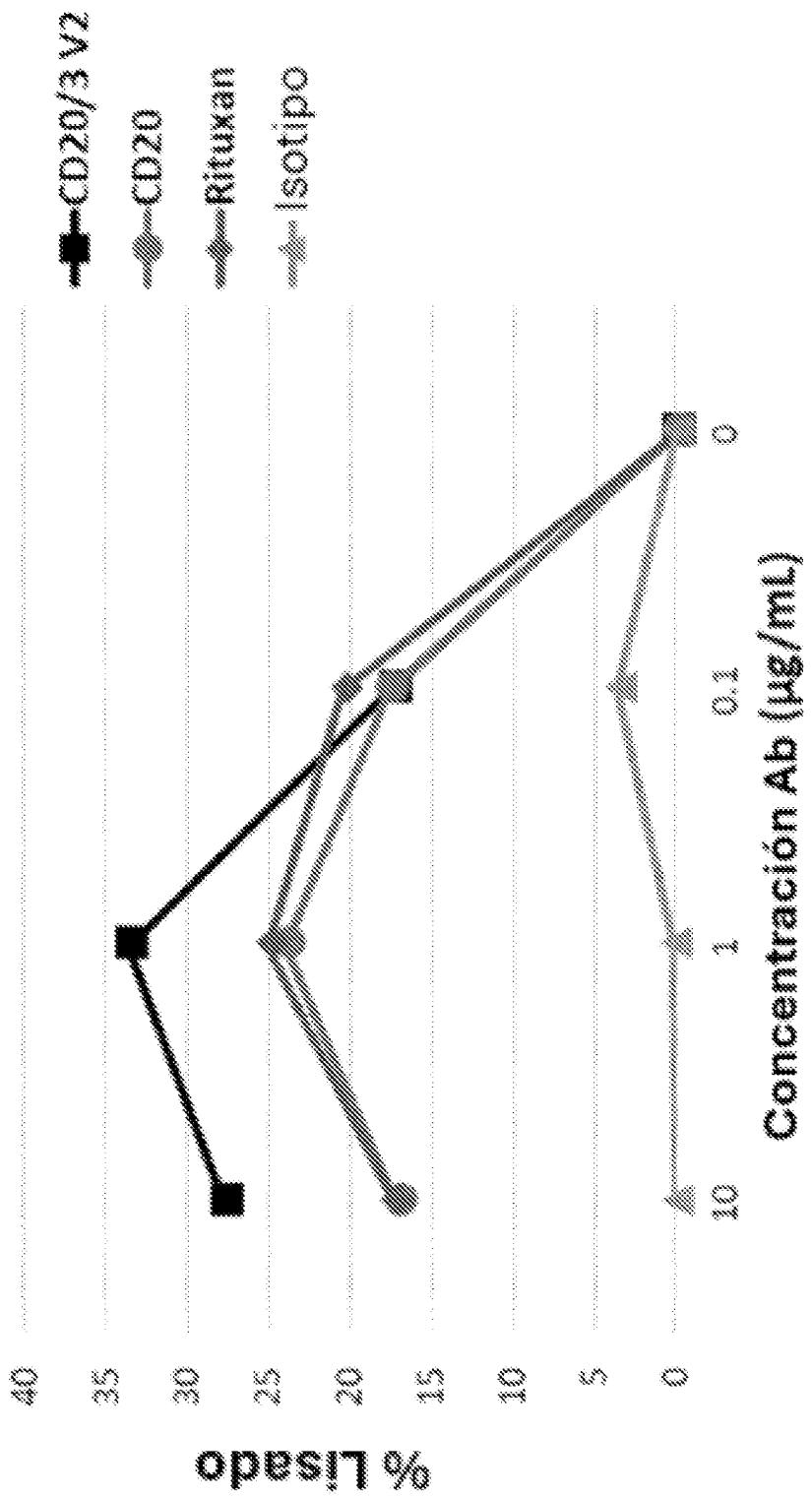


FIG. 5

Lisis ADCC de células Raji después de la activación de células T de 96 h

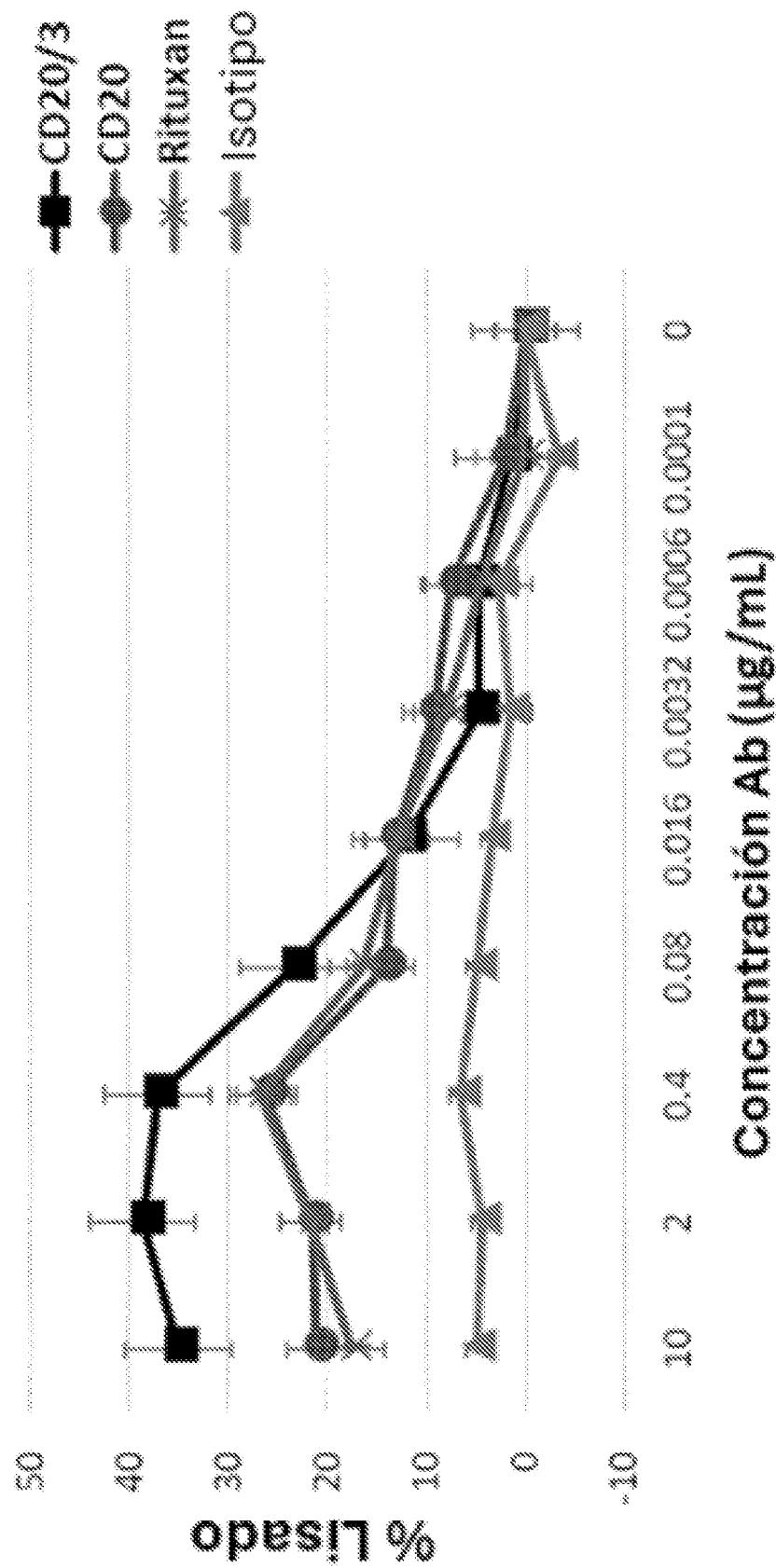


FIG. 6

Lisis ADCC de células Raji después de la activación de células T de 7 días

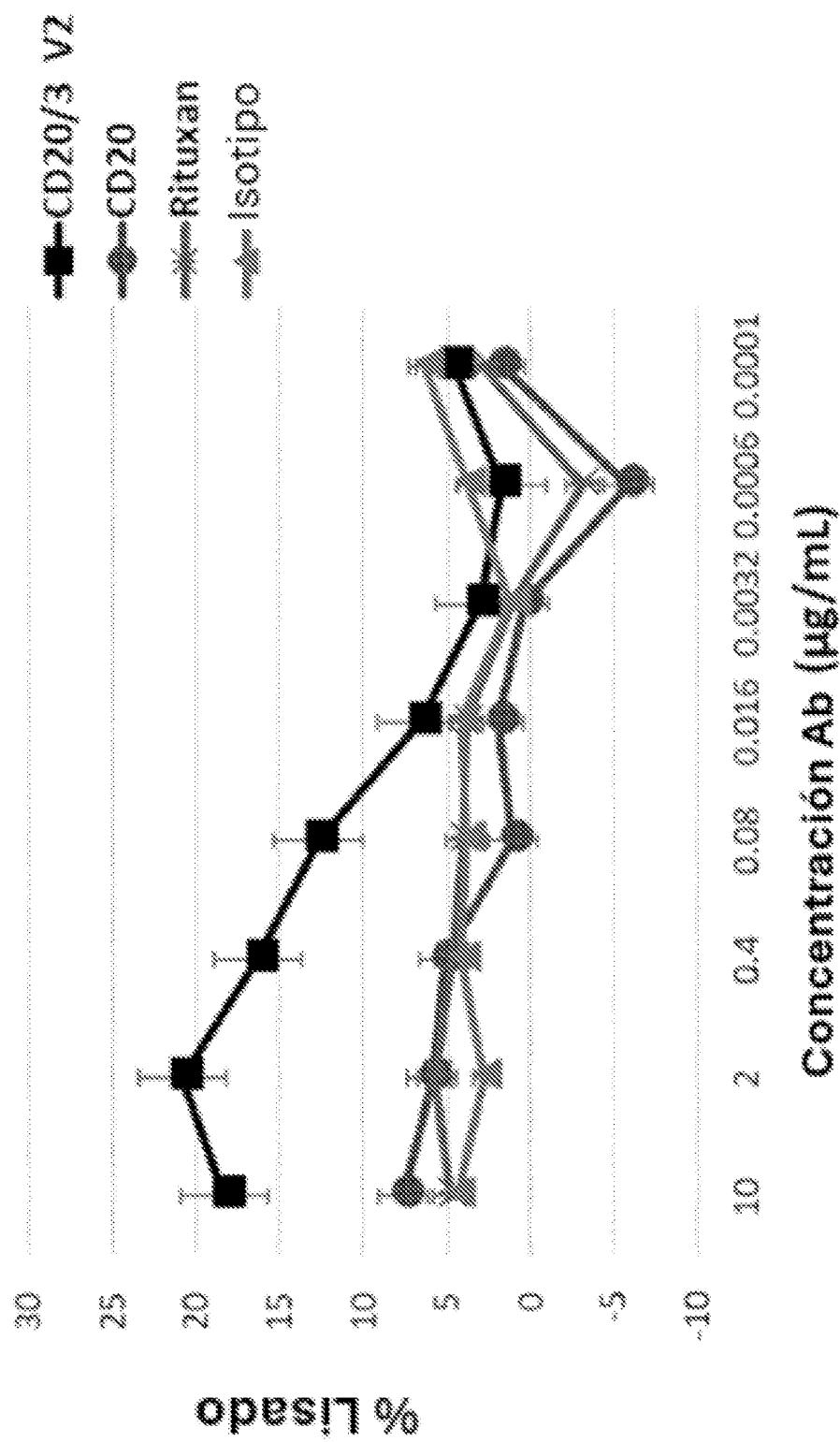
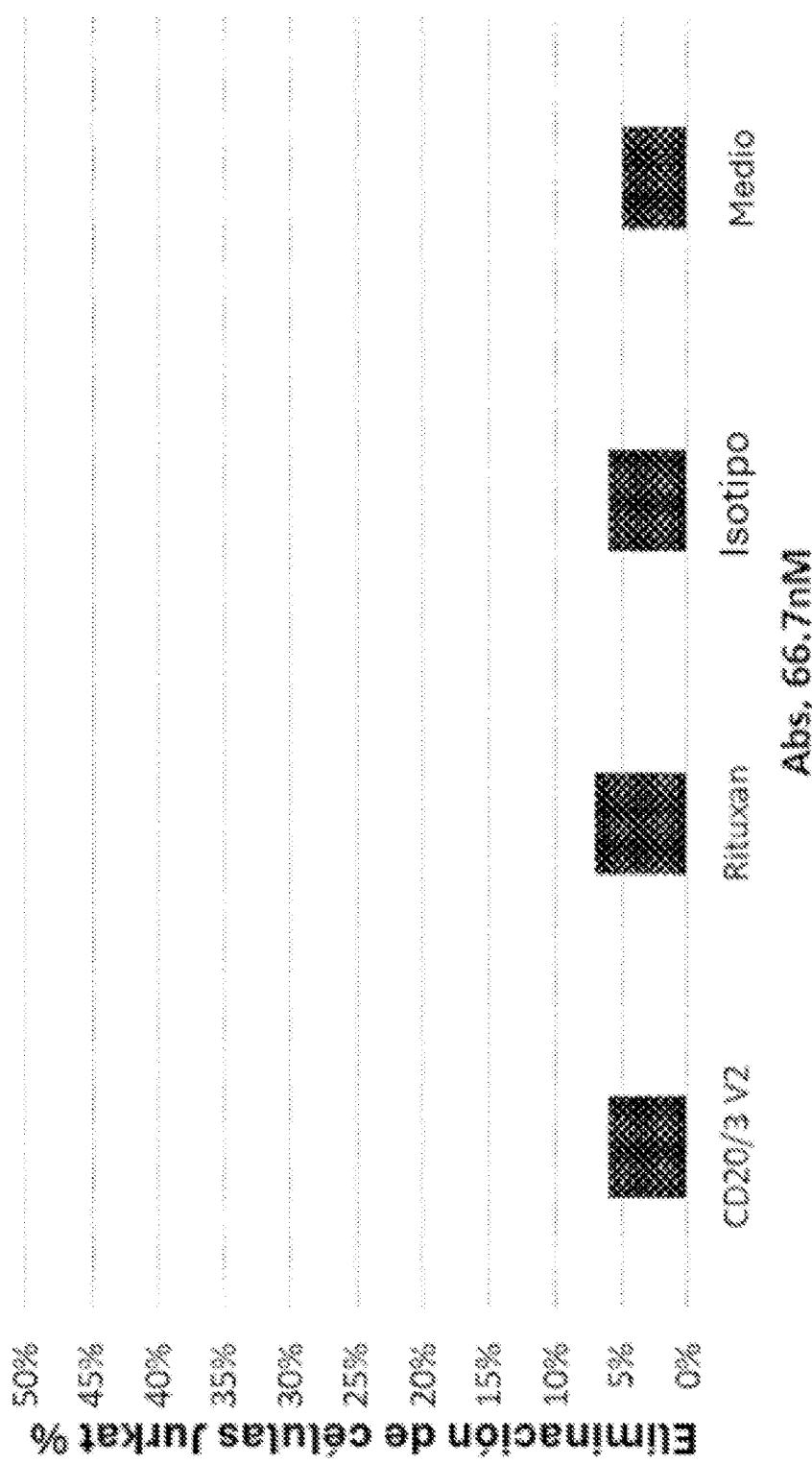


FIG. 7

Eliminación de células Jurkat inducida por Abs



Abs, 66.7mM

FIG. 8

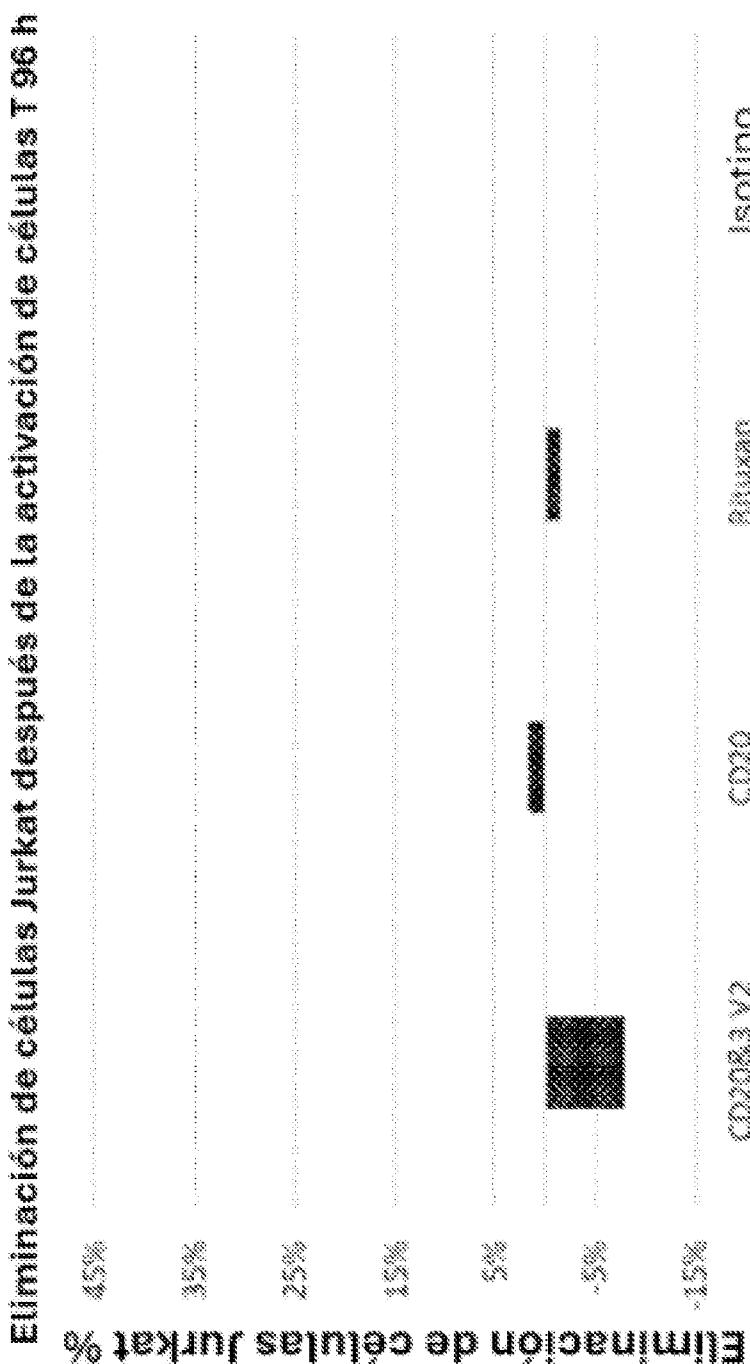
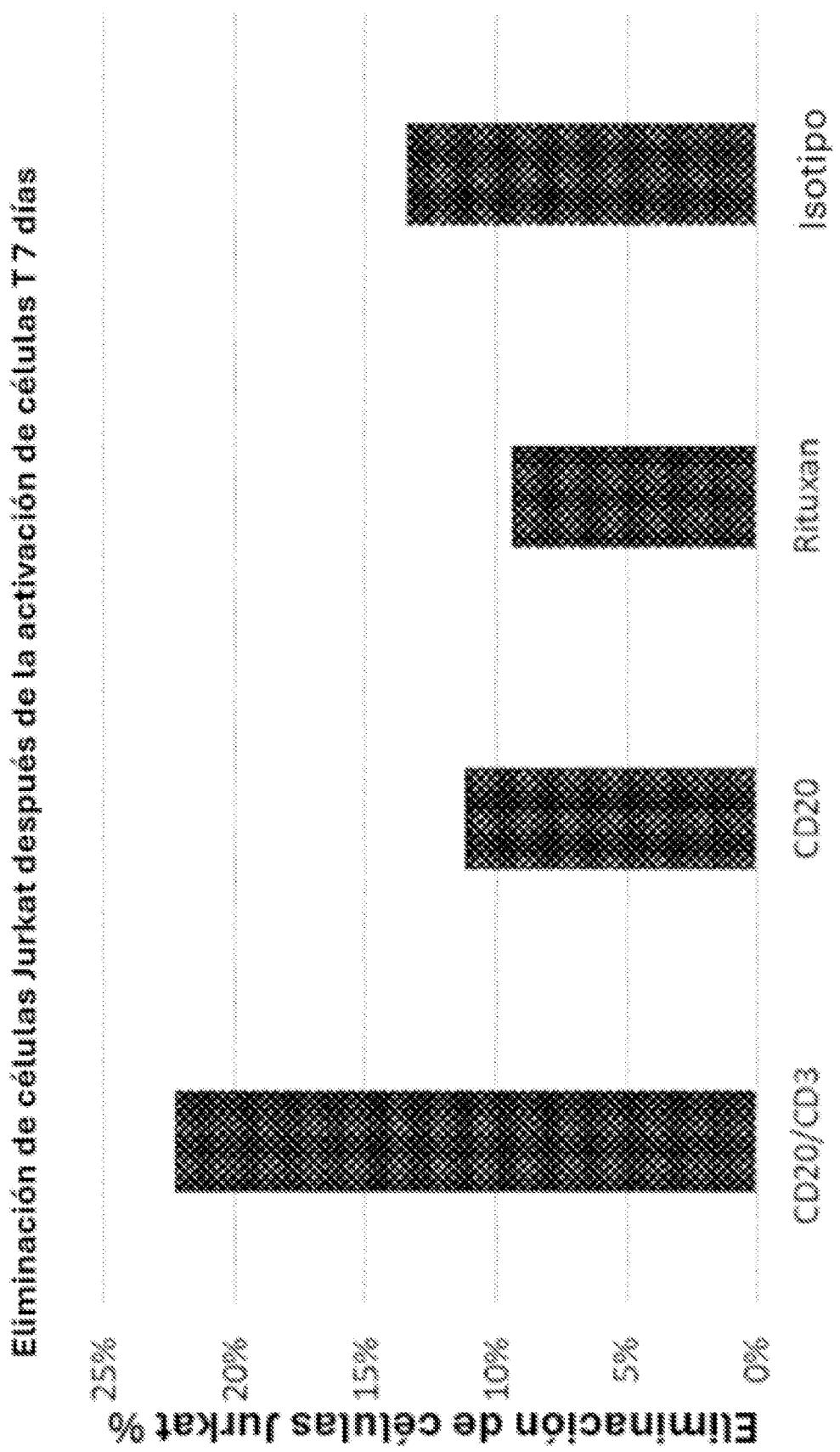


FIG. 9
Abs 66,7mM



Reducción de células T inducida por anticuerpos

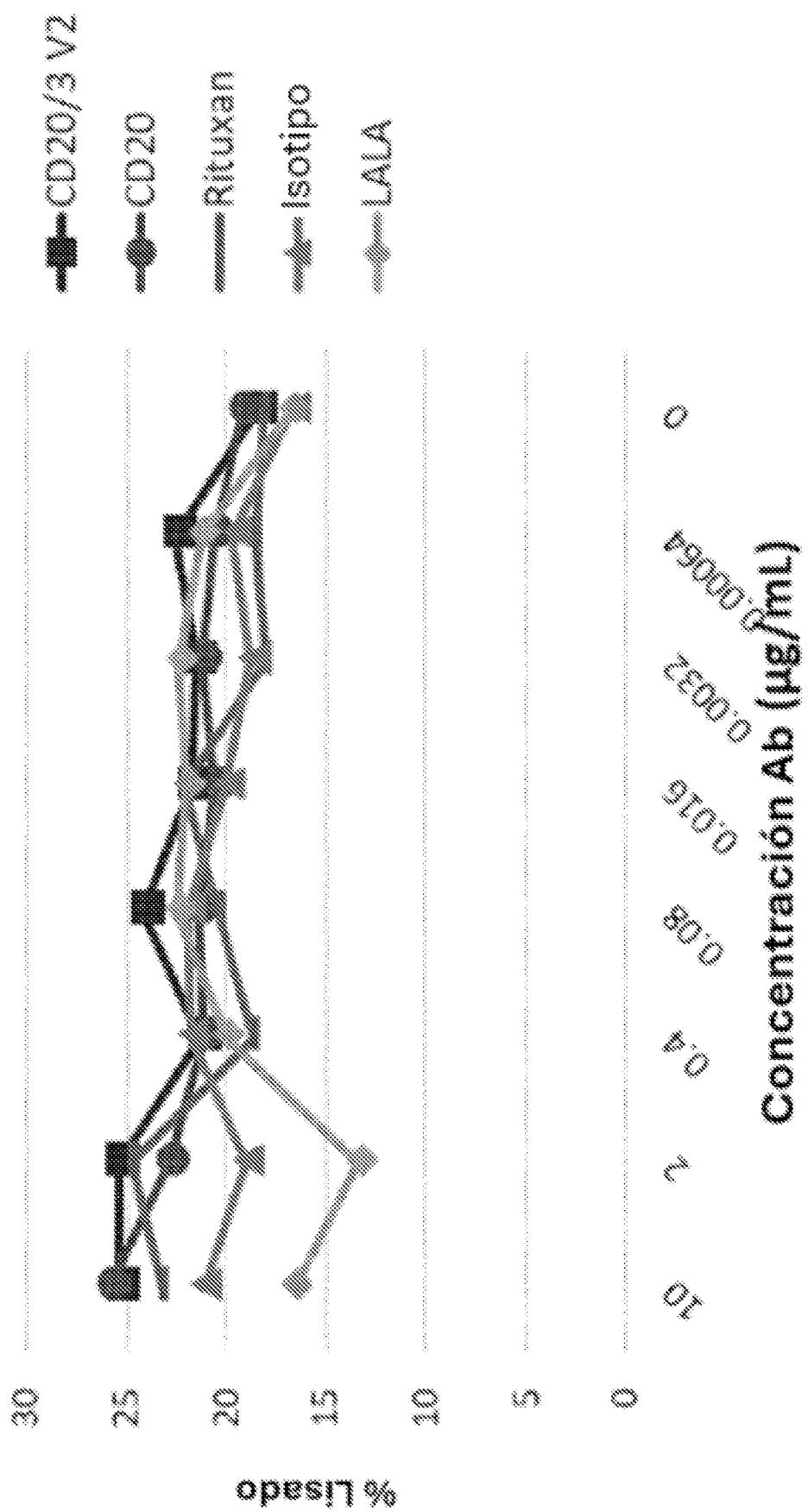


FIG. 11

Reducción de células T inducida por anticuerpos

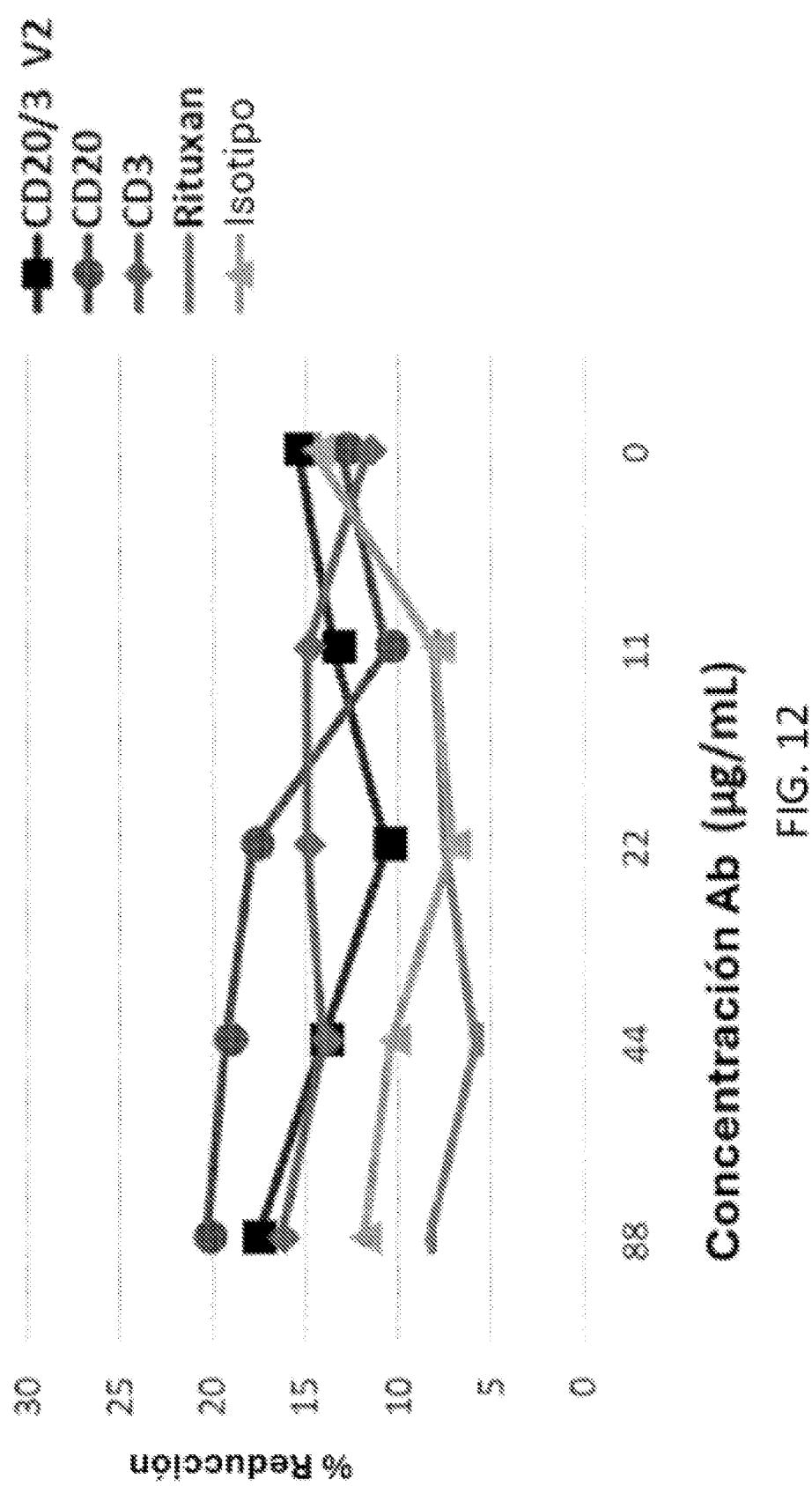


FIG. 12

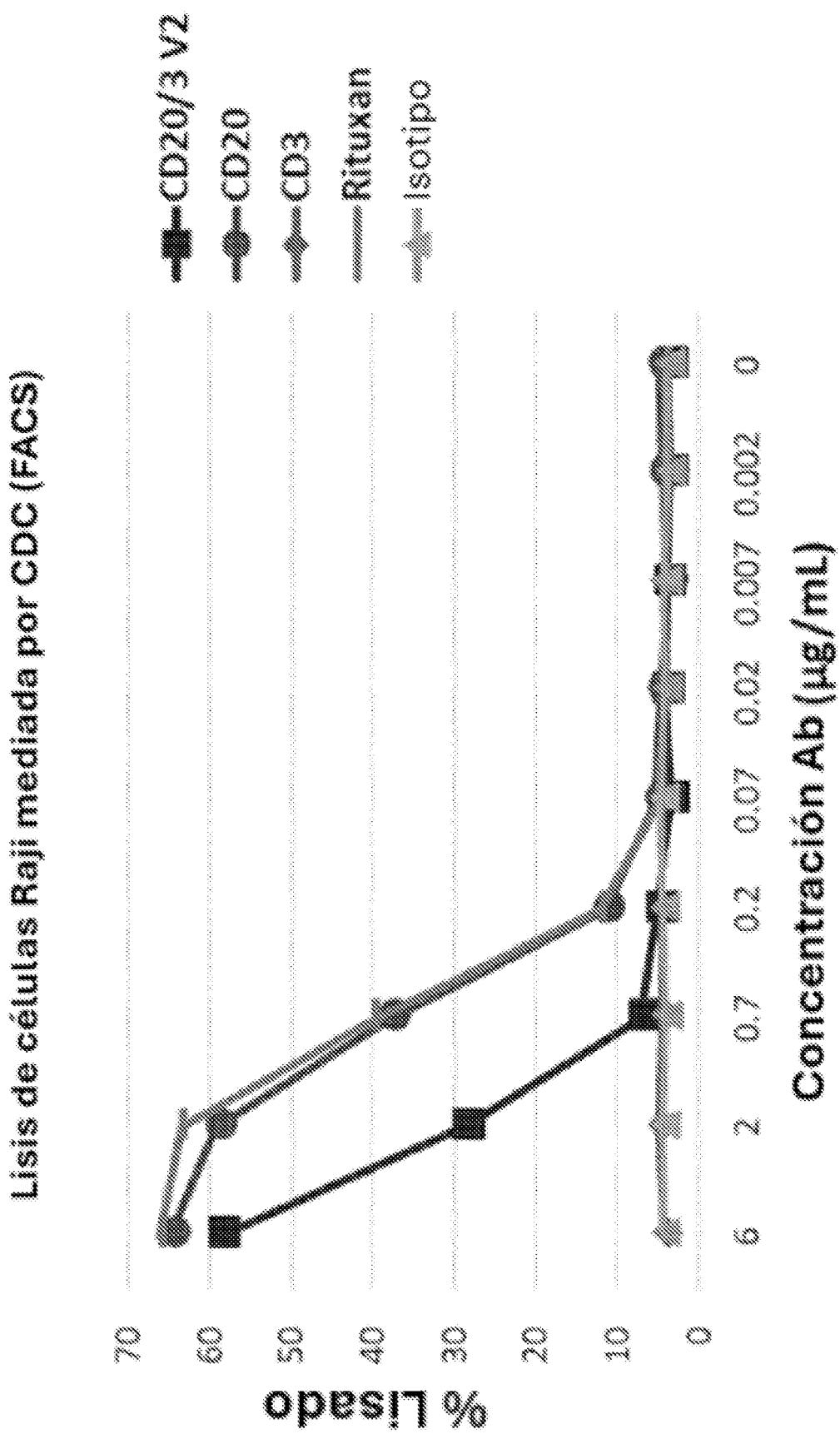


FIG. 13

Lisis de células Raji mediada por CDC (calceína)

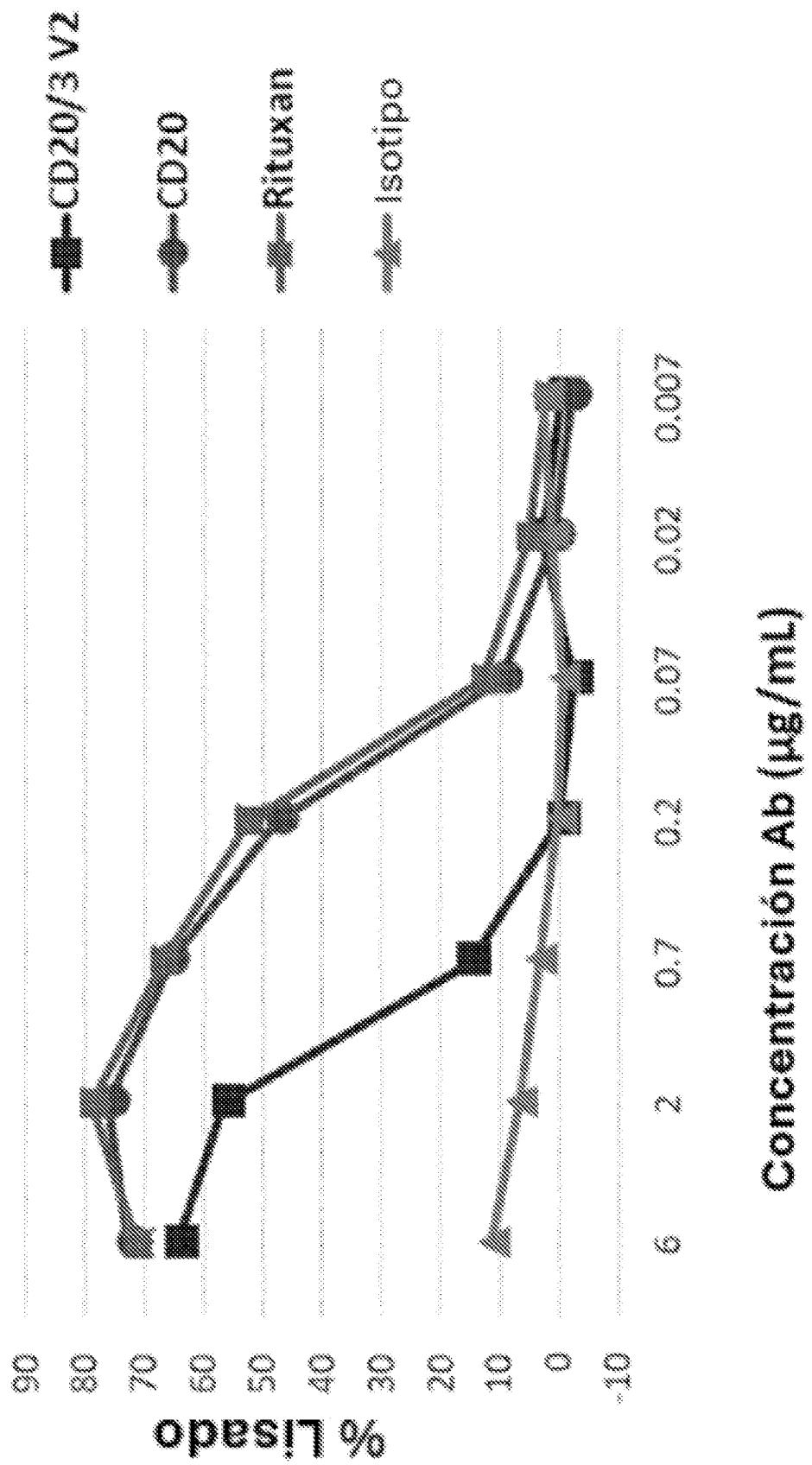


FIG. 14

Lisis de células Jurkat mediada por CDC (FACS)

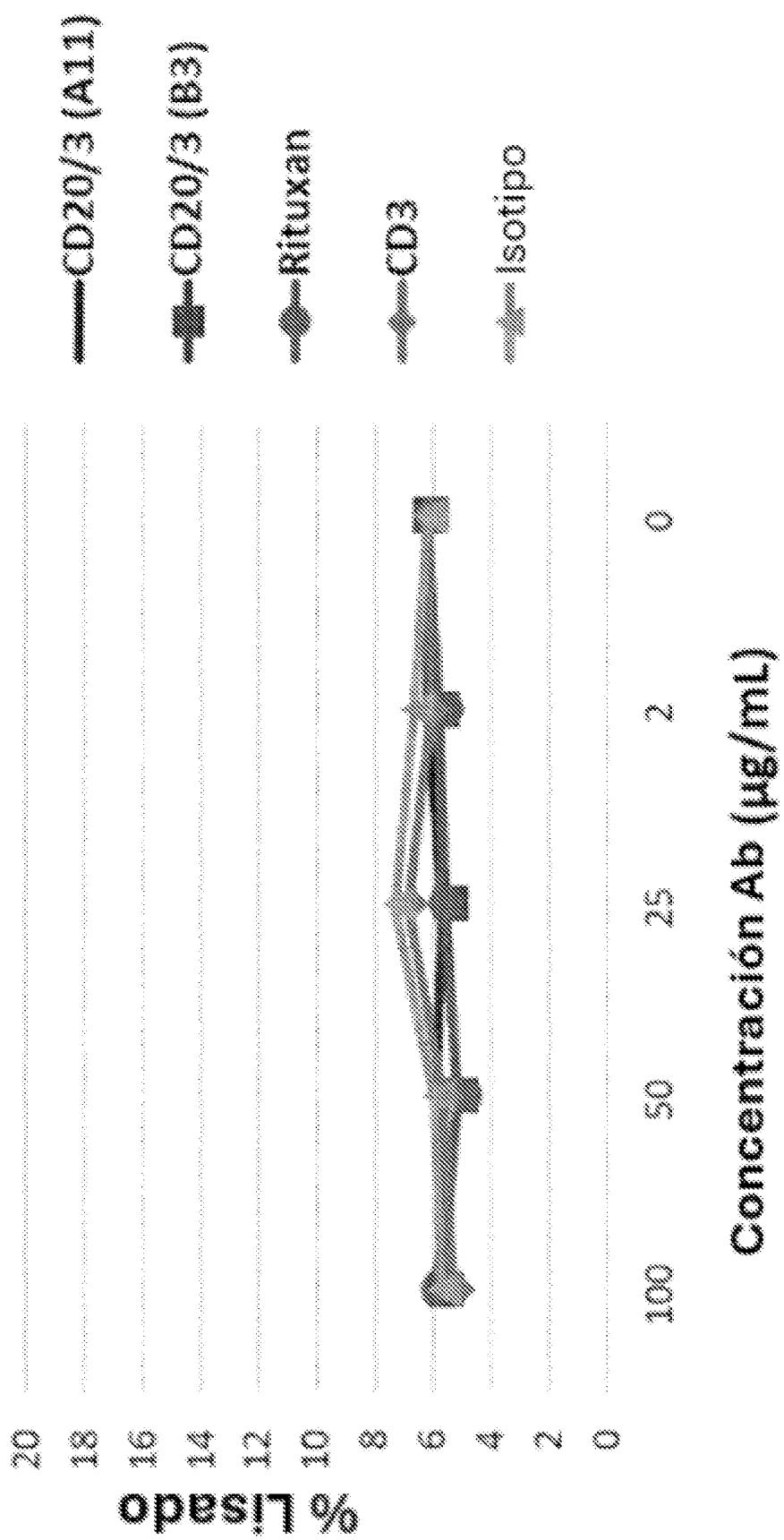


FIG. 15

Reducción de células T mediada por anticuerpos

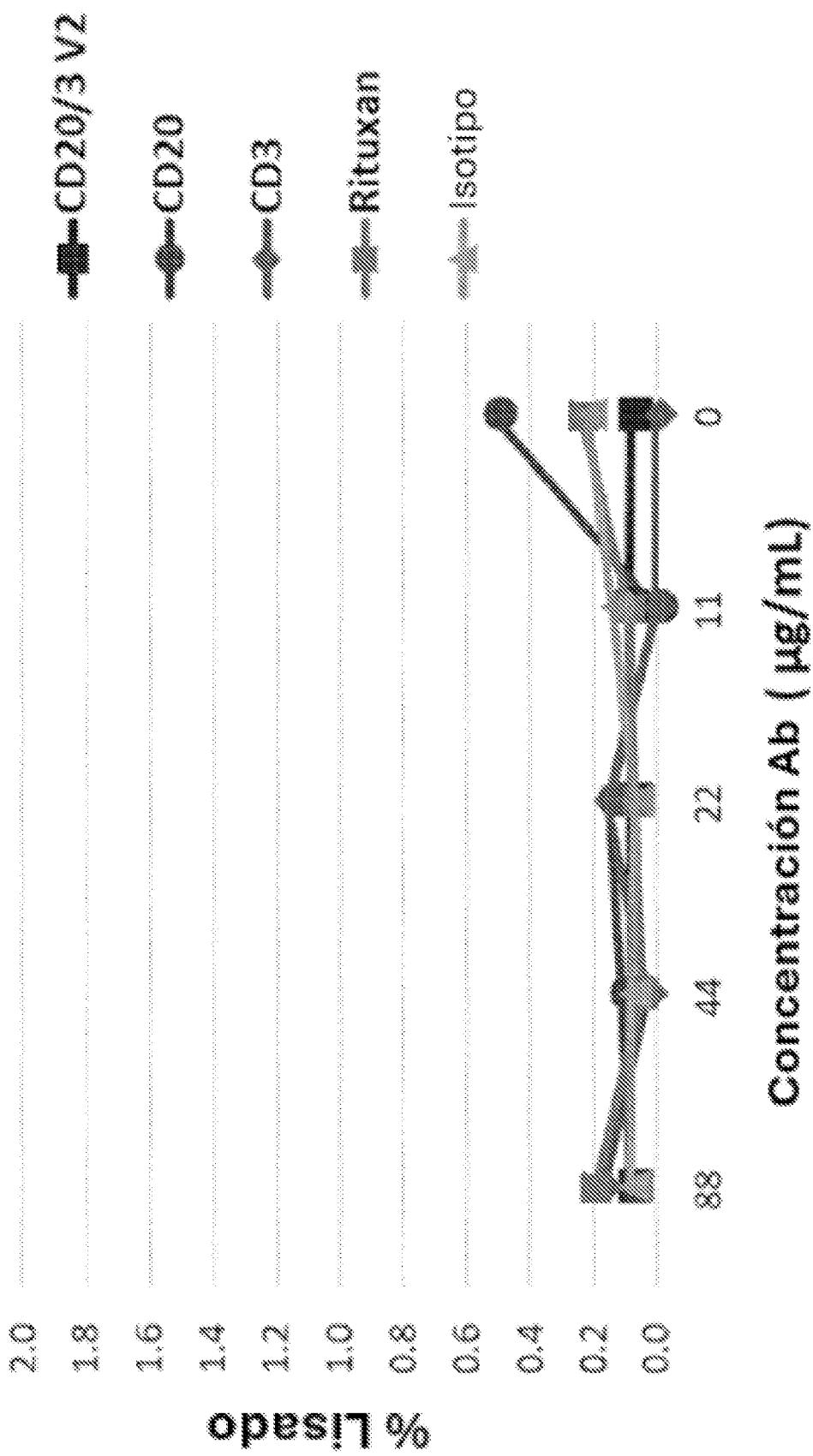


FIG. 16

Eliminación de células RRCL inducida por Abs basados en PBMC activado 7 días/donante 1

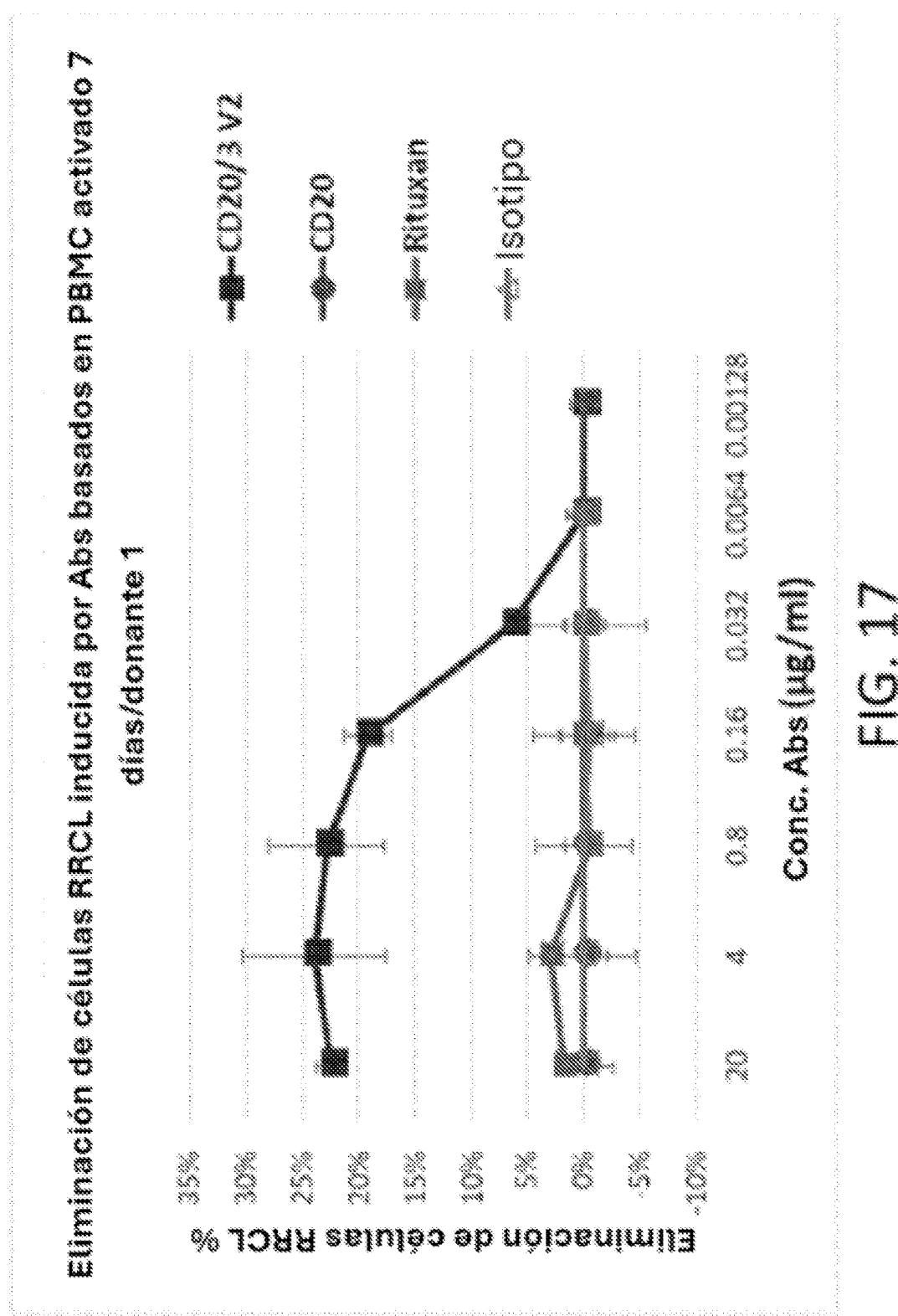


FIG. 17

Eliminación de células RRCCL inducida por Abs basados en PBMC activado 7 días/donante 2

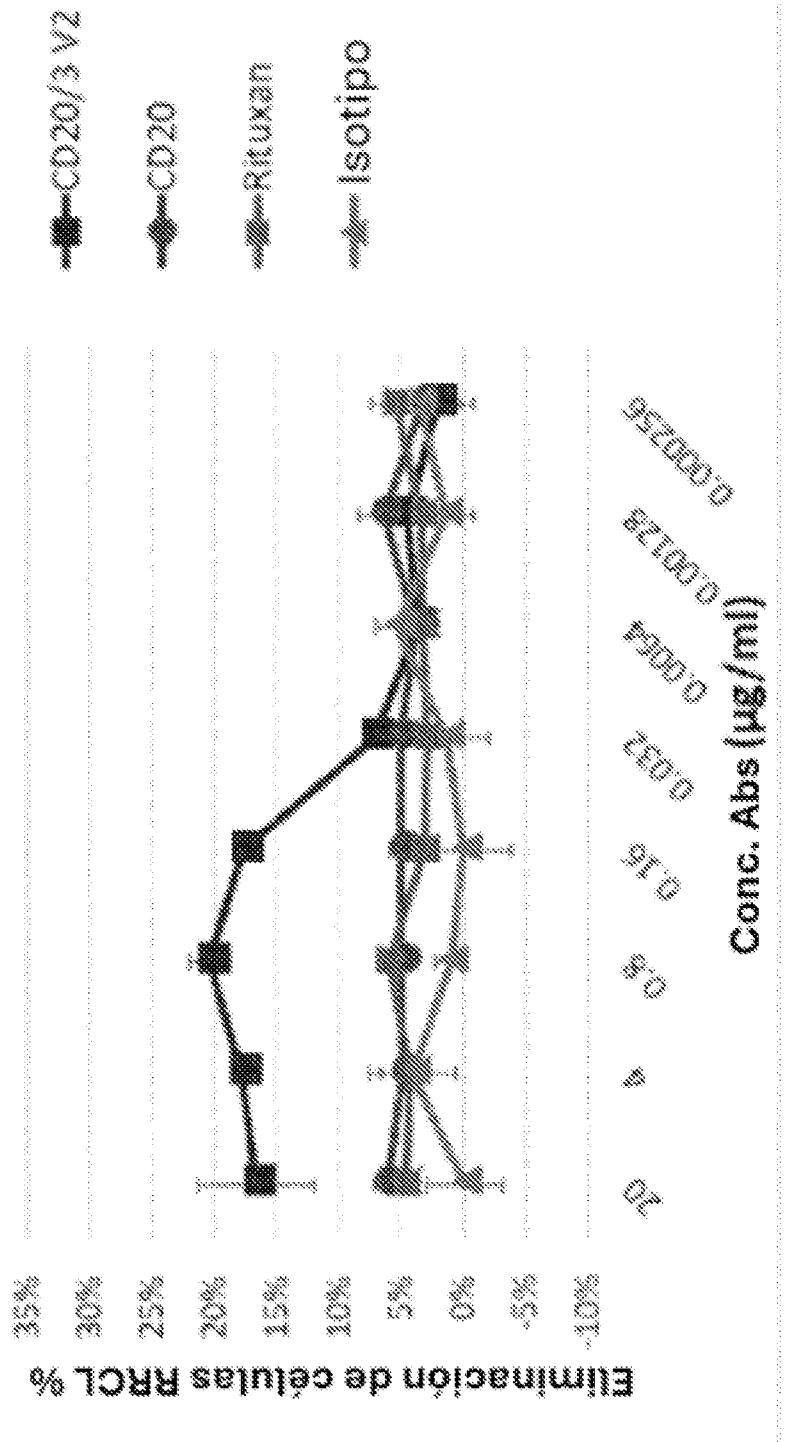
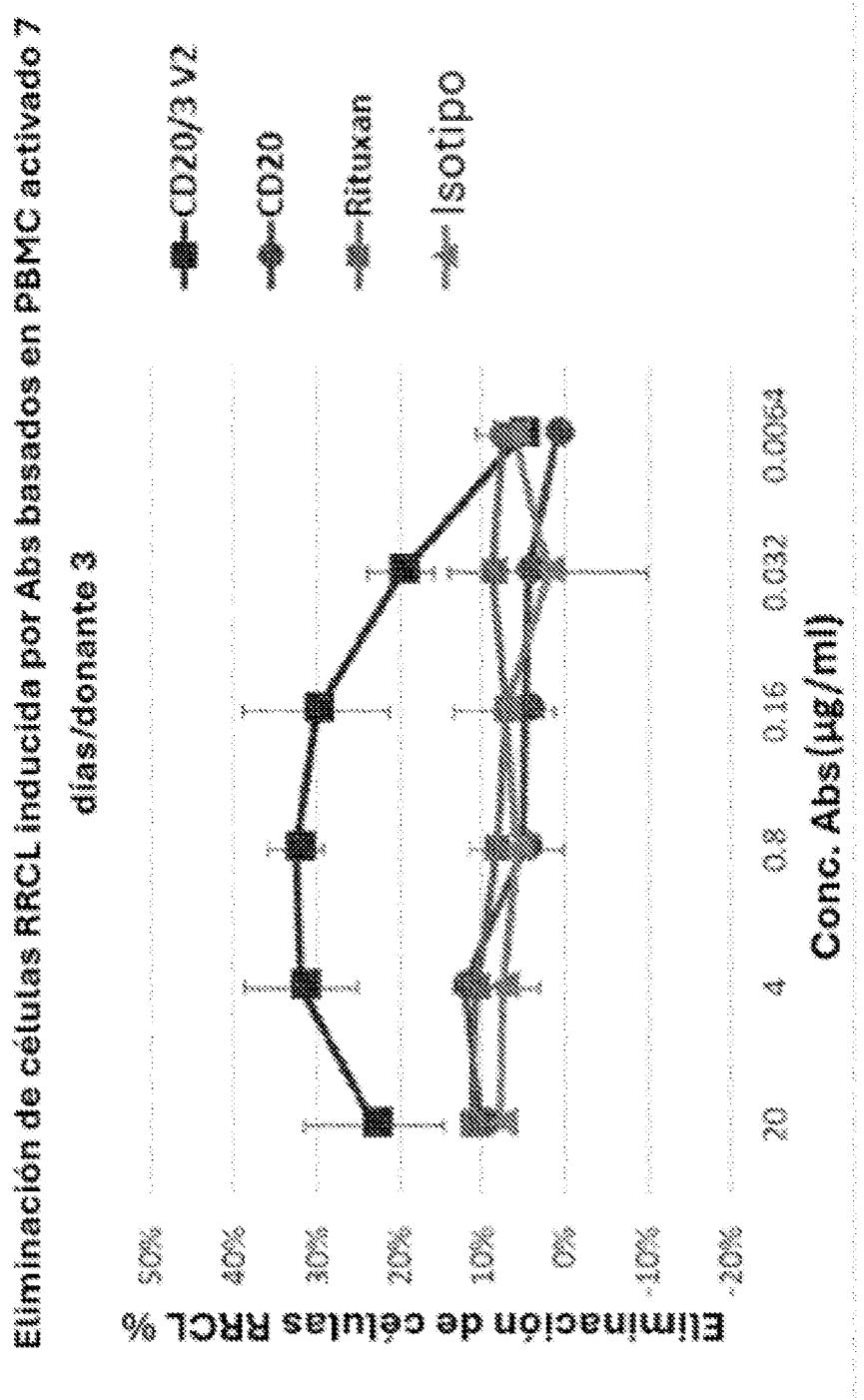


FIG. 18



Activación de células T para la evaluación de Abs purificados

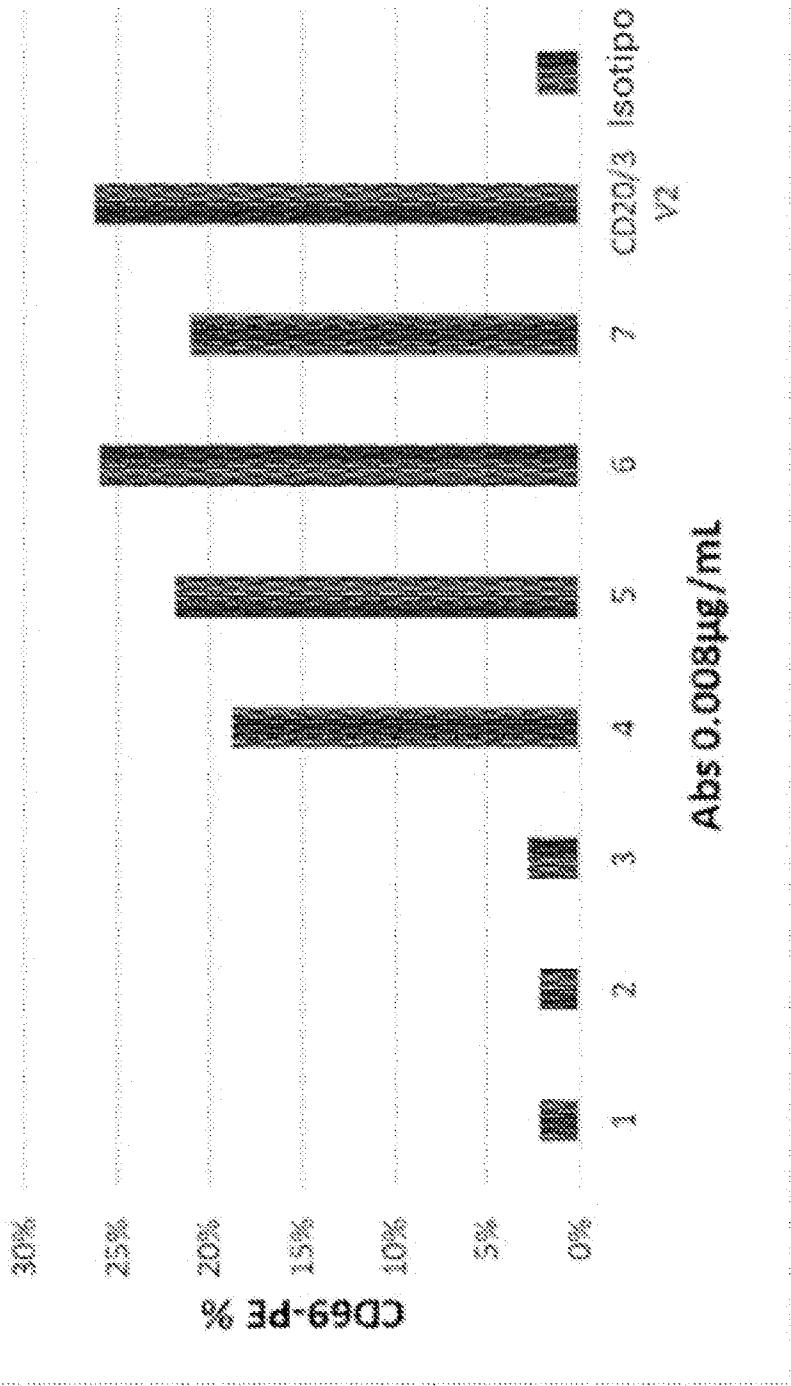


FIG. 20

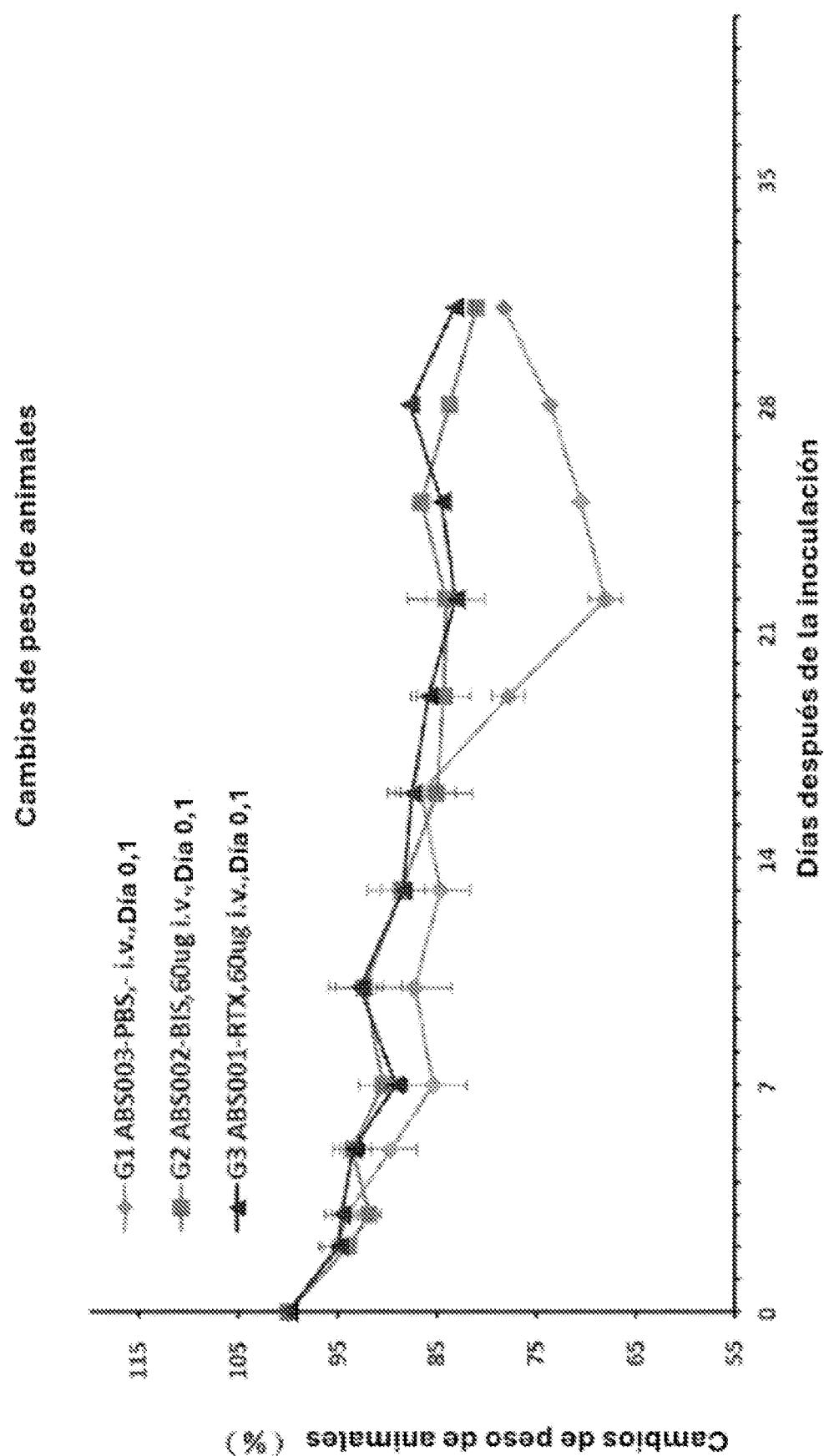


FIG. 21A

Intensidad de señales de imagenología de animales

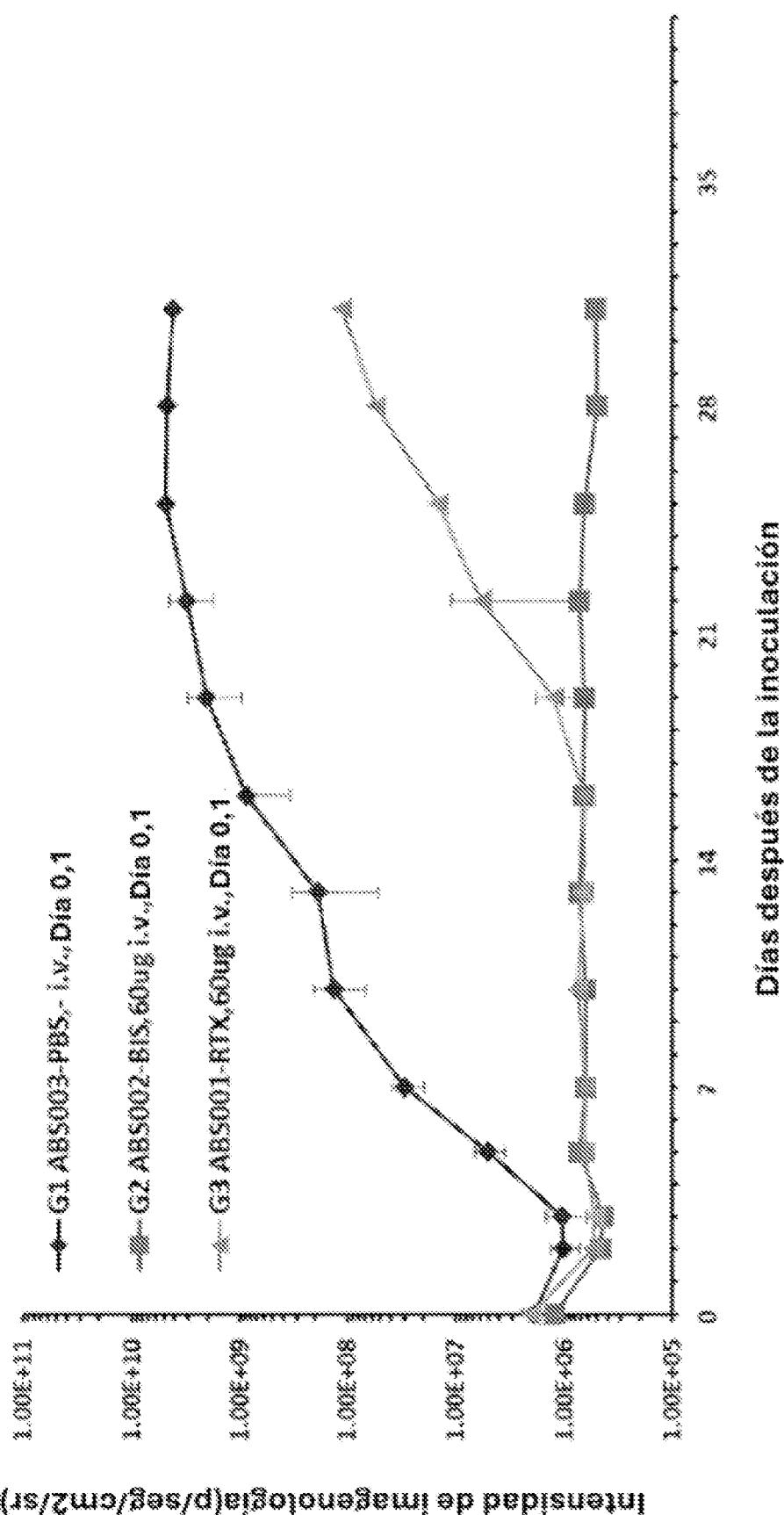


FIG. 21B

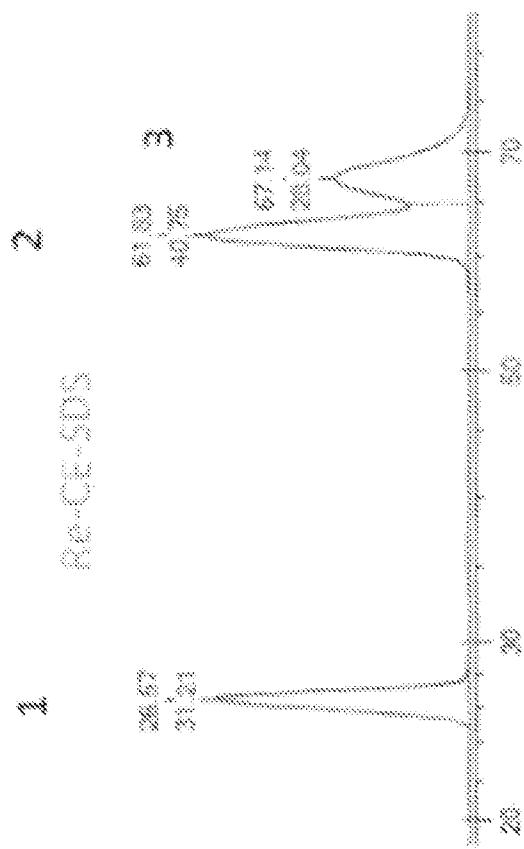


FIG. 22A

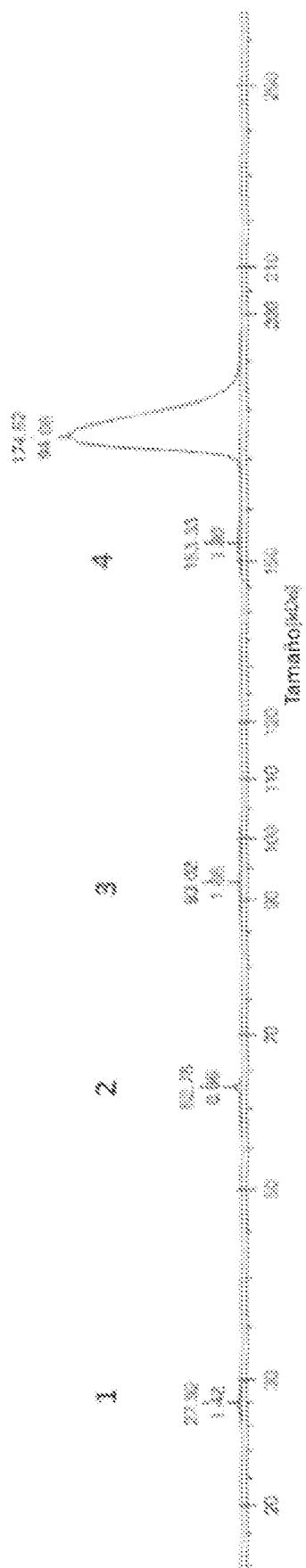


FIG. 22B

Unión de p23L1 a MDA 231

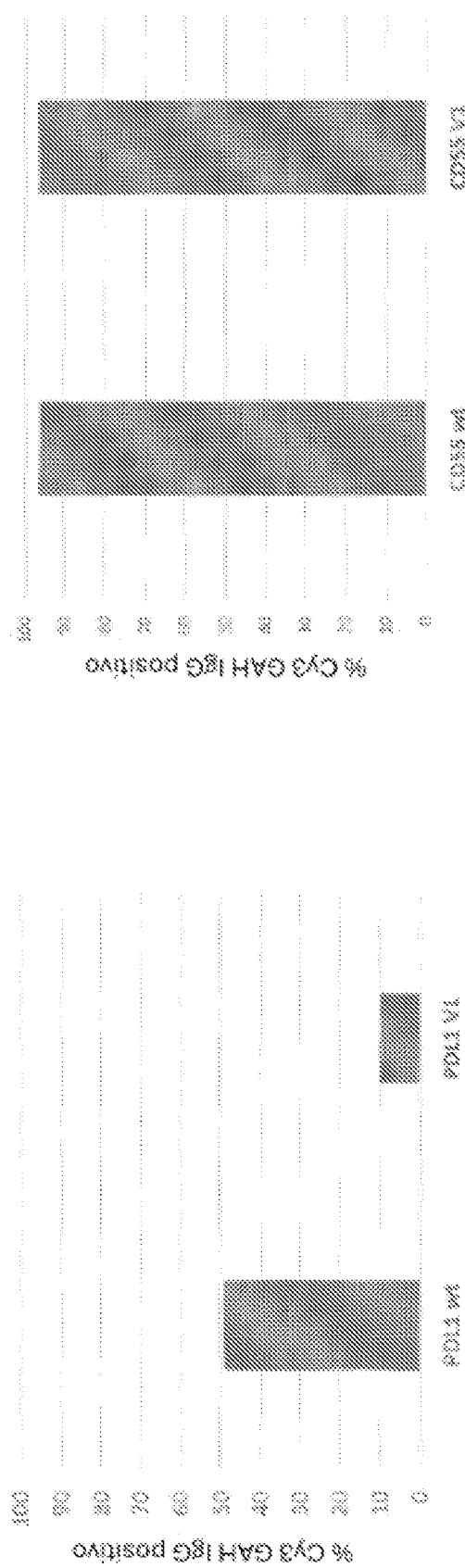


FIG. 23A

Unión de CB55 a MDA 231

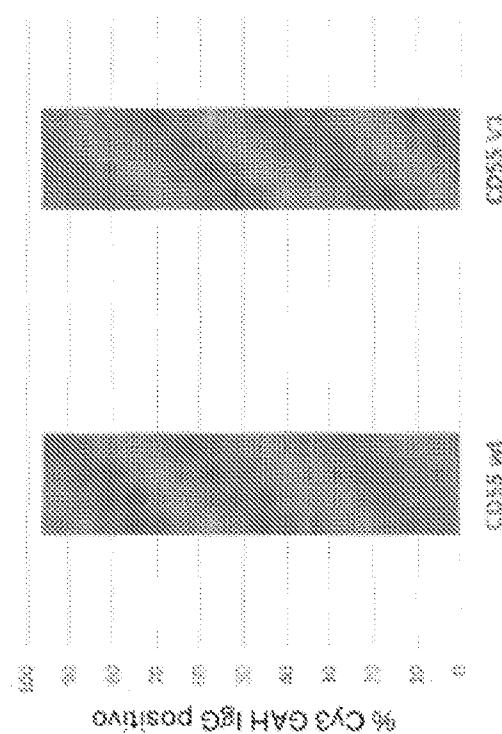
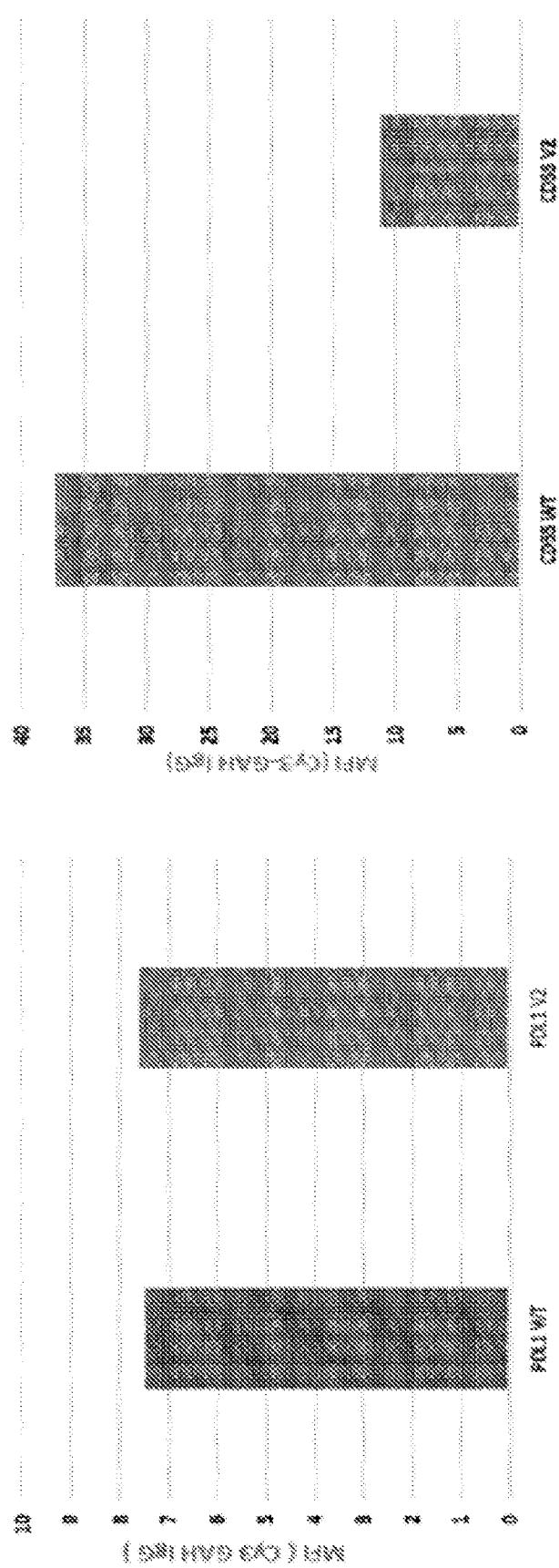


FIG. 23B

Mayoría	GSAT T GPGVSSGSPGASH T T SGTGTSSSDGGSYVVSQGKQHPSKAKPL MS YDVSXHPSGV									
	16	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cl común para BsAb v2	GSAT T GPGVSSGSPGASH T T SGTGTSSSDGGSYVVSQGKQHPSKAKPL MS YDVSXHPSGV									
	16	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cl común para BsAb v3	GSAT T GPGVSSGSPGASH T T SGTGTSSSDGGSYVVSQGKQHPSKAKPL MS YDVSXHPSGV									
	16	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Mayoría	GWTGSSKGGTASL T T SGTGATGPGVSSYTSKTRTGTGTTVAKPQVPL									
	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
Cl común para BsAb v2	GWTGSSKGGTASL T T SGTGATGPGVSSYTSKTRTGTGTTVAKPQVPL									
	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
Cl común para BsAb v3	GWTGSSKGGTASL T T SGTGATGPGVSSYTSKTRTGTGTTVAKPQVPL									
	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
Mayoría	T PPGSDEQKSGTASVPL L WTVVPEAKVQWVQHQLCSGSCE SVTGTGQSKQSYVLS									
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
Cl común para BsAb v2	T PPGSDEQKSGTASVPL L WTVVPEAKVQWVQHQLCSGSCE SVTGTGQSKQSYVLS									
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
Cl común para BsAb v3	T PPGSDEQKSGTASVPL L WTVVPEAKVQWVQHQLCSGSCE SVTGTGQSKQSYVLS									
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
Mayoría	T T T T SKAOYEVKHKVYACEVTHQQL S S P V T K S P M G C C									
	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280
Cl común para BsAb v2	T T T T SKAOYEVKHKVYACEVTHQQL S S P V T K S P M G C C									
	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280
Cl común para BsAb v3	T T T T SKAOYEVKHKVYACEVTHQQL S S P V T K S P M G C C									
	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280

FIG. 24

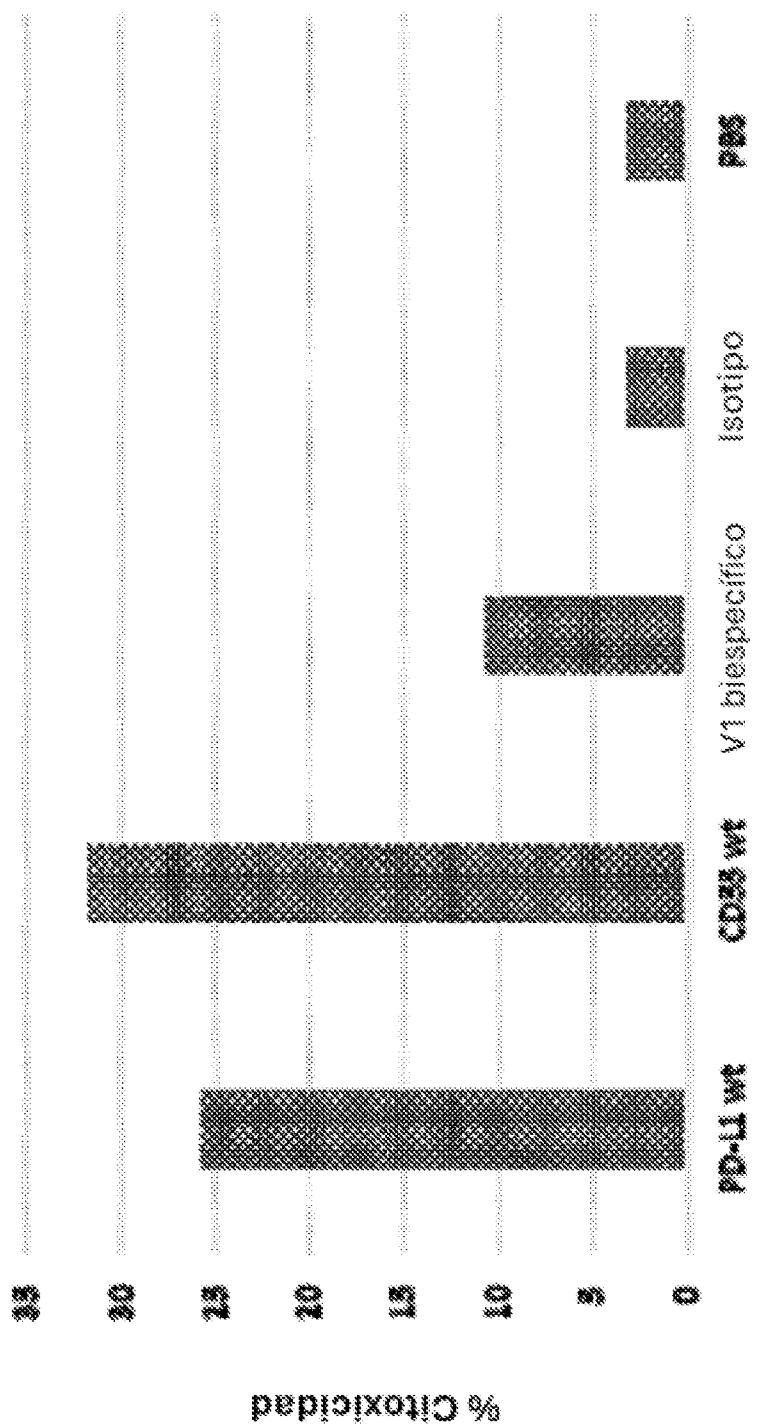
Unión de CD55 a MDA231



Concentración Ab: 0.63 µg/ml

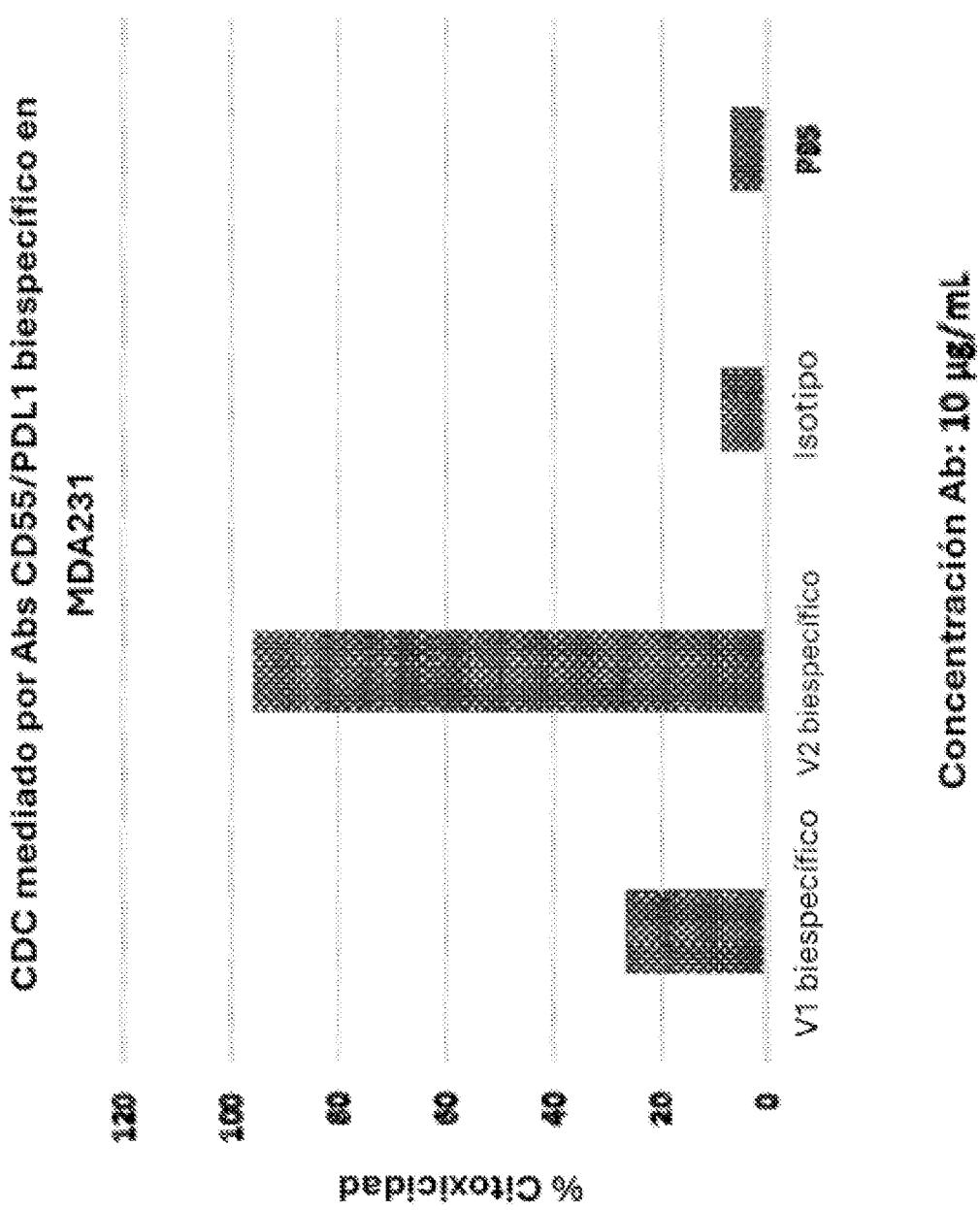
FIG. 25A
FIG. 25B

CDC mediado por PD-L1 y CD55 en células MDA231

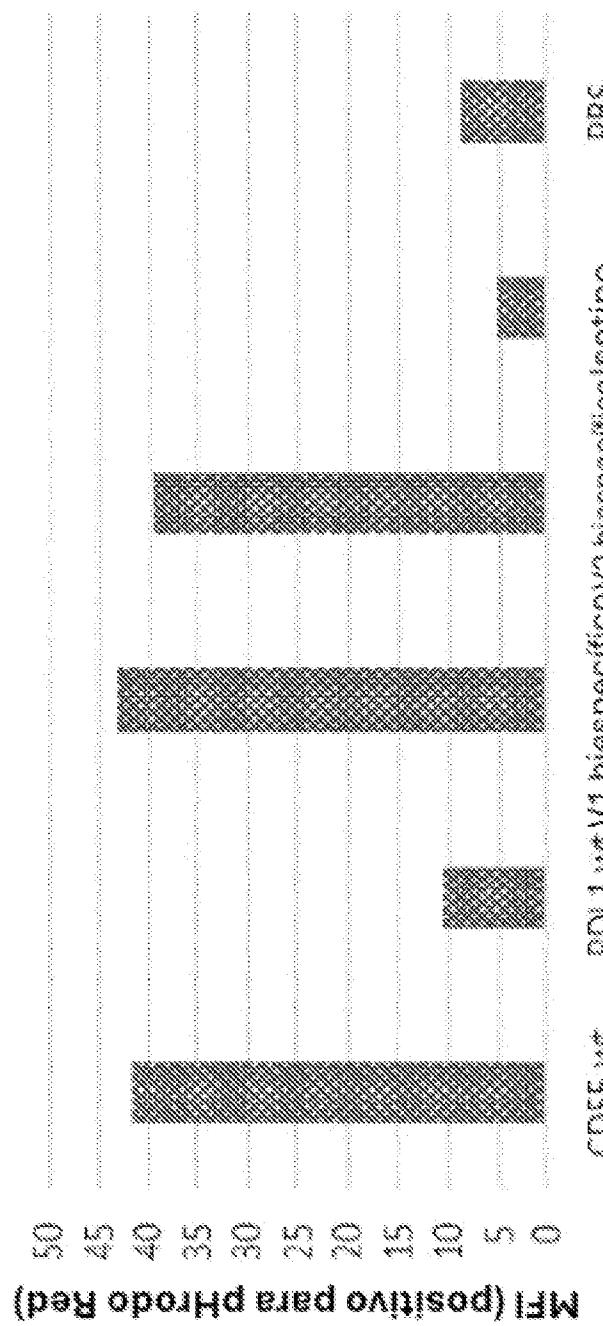


Concentración Ab: 10 μ g/ml

FIG. 26A



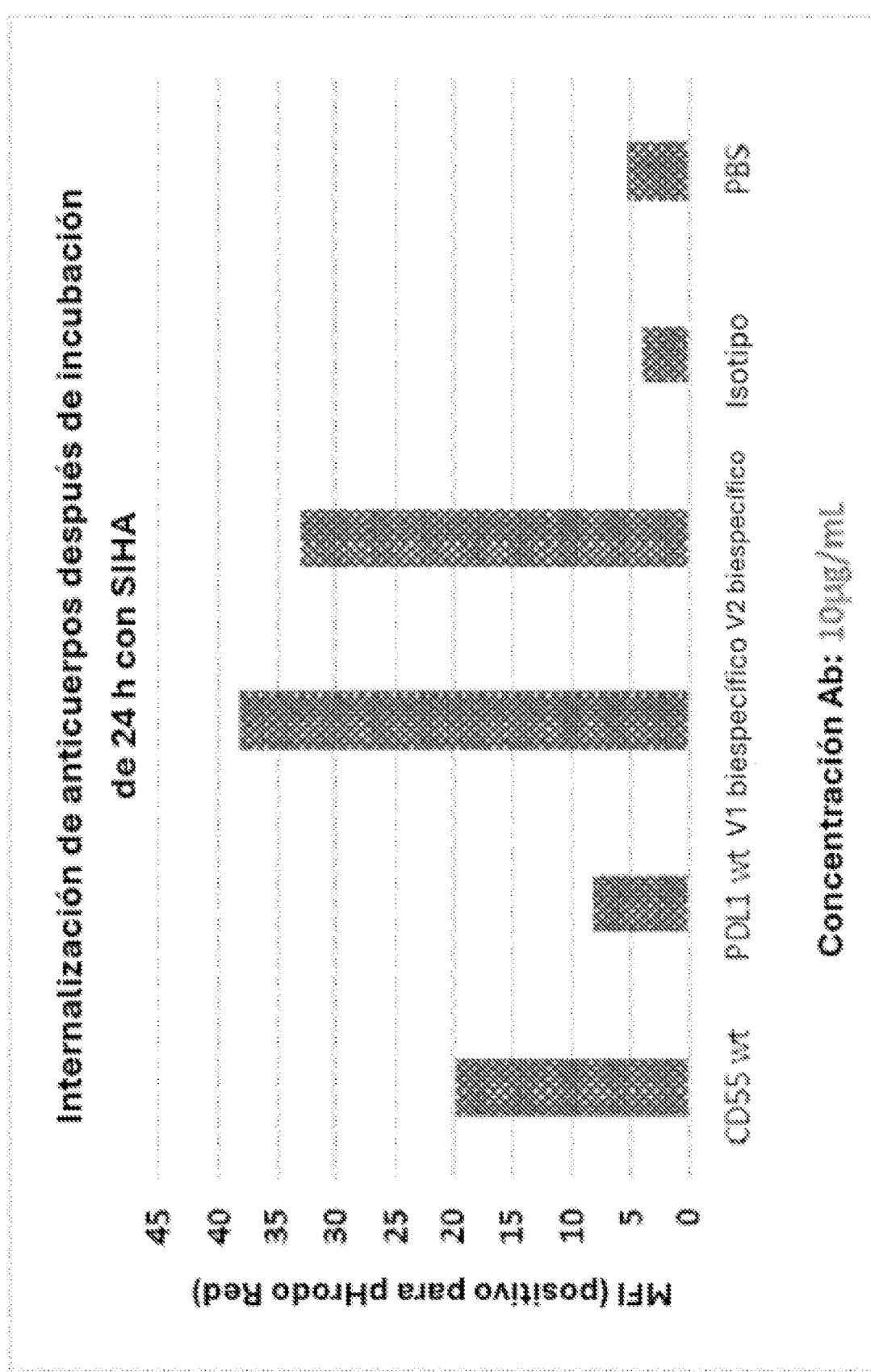
**Internalización de anticuerpos después de incubación
de 24 h con MDA231**



Concentración Ab: 10 μ g/ml.

CD55 wt PDL1 wt V1 biespecífico lisotípico PBS

FIG. 27A



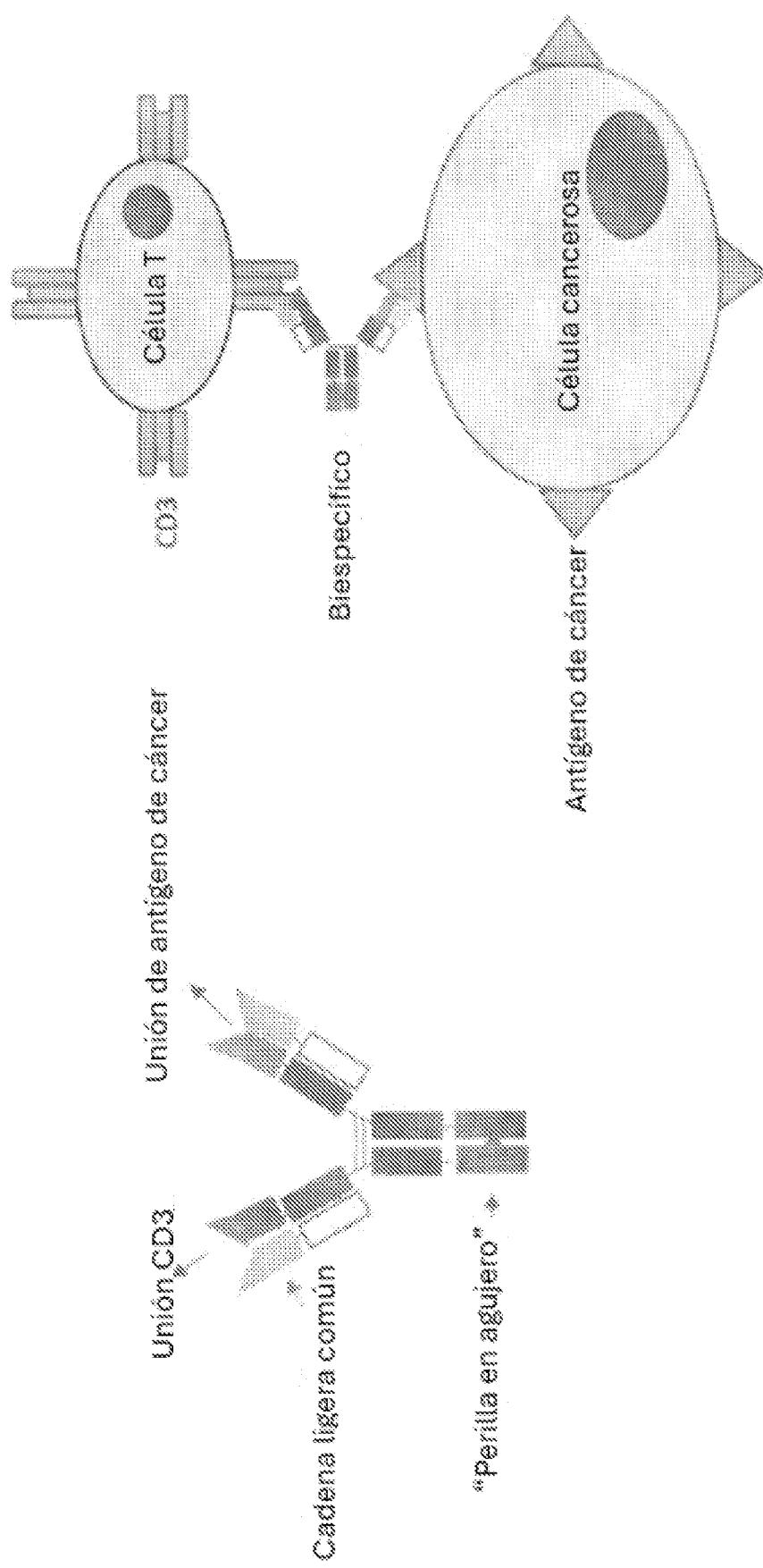


FIG. 28

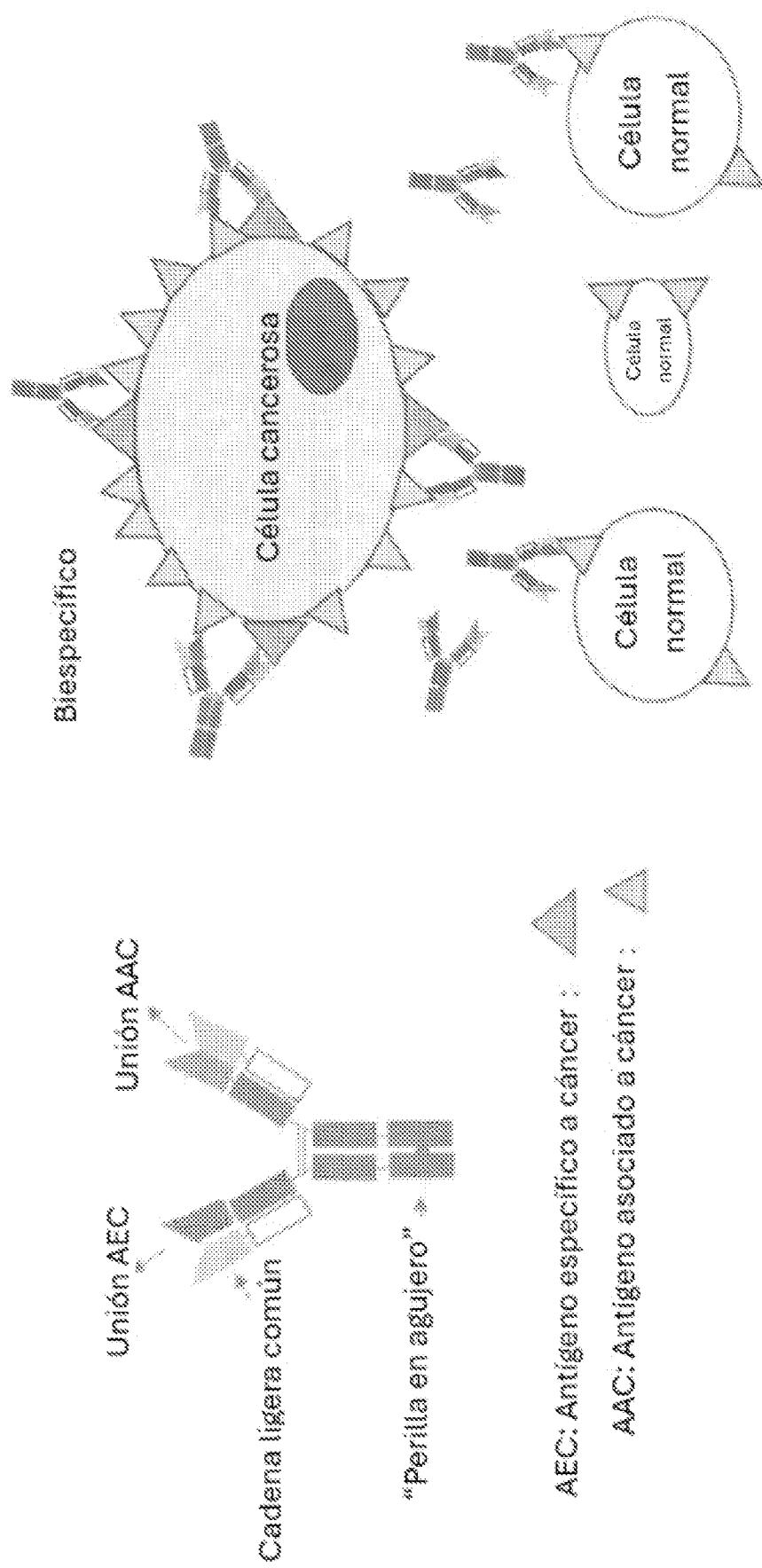


FIG. 29