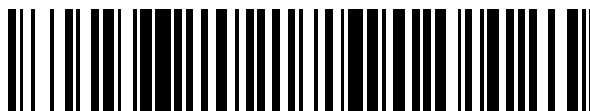


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 051**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2015** **E 15179545 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016** **EP 2982694**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos contra CD3ε y BCMA**

30 Prioridad:

**04.08.2014 EP 14179705**

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

**17.02.2017**

73 Titular/es:

**ENGMAB AG (100.0%)  
Etzelstrasse 27  
8808 Pfäffikon, CH**

72 Inventor/es:

**VU, MINH;  
STREIN, KLAUS;  
AST, OLIVER;  
BACAC, MARINA;  
HANISCH, LYDIA JASMIN;  
FAUTI, TANJA;  
FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, ANNE;  
HOSSE, RALF;  
KLEIN, CHRISTIAN;  
MOESSNER, EKKEHARD;  
MOSER, SAMUEL;  
MURR, RAMONA;  
UMANA, PABLO;  
JUNG-IMHOF, SABINE;  
KLOSTERMANN, STEFAN;  
MOLHOJ, MICHAEL;  
REGULA, JOERG y  
SCHAEFER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 602 051 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 contra CD3 $\epsilon$  y BCMA

La presente invención se refiere a los nuevos anticuerpos biespecíficos contra CD3 $\epsilon$  y BCMA, su fabricación y uso.

**Antecedentes de la Invención**

5 El antígeno de maduración de las células B también conocido como BCMA; TR17\_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral que se expresa preferentemente en las células plasmáticas diferenciadas (Laabi et al. 1992; Madry et al. 1998). El BCMA es una proteína transmembrana tipo III no glicosilada, que está implicada en la maduración, crecimiento y sobrevida de las células B. El BCMA es un receptor para dos ligandos de la superfamilia del TNF: APRIL (un ligando inductor de la proliferación),  
10 que es el ligando de alta afinidad del BCMA y el factor de activación de células B BAFF, que es el ligando de baja afinidad del BCMA (THANK, BlyS, estimulador de linfocitos B, TALL-1 y zTNF4). APRIL y BAFF presentan una estructura muy similar y superpuesta, no obstante, la especificidad de unión al receptor es distinta. El regulador negativo TACI también se une a ambas proteínas BAFF y APRIL. La unión coordinada de APRIL y BAFF al BCMA y/o TACI activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B y aumenta la expresión de los miembros de la familia de factores anti-apoptóticos Bcl-2 (por ej., Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) y disminuye la regulación de los factores pro-apoptóticos (por ej., Bid, Bad, Bik, Bim, etc.), inhibiendo así la apoptosis y promoviendo la supervivencia. Esta acción combinada promueve la diferenciación, proliferación y supervivencia de las células B como así también la producción de anticuerpos por parte de estas (tal como se describe en Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133).

El complejo TCR/CD3 de los linfocitos T consiste en un heterodímero TCR alfa ( $\alpha$ )/beta ( $\beta$ ) o en un heterodímero TCR gamma ( $\gamma$ )/delta ( $\delta$ ) co-expresado sobre la superficie celular con las subunidades invariantes del CD3 gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), zeta ( $\zeta$ ), y eta ( $\eta$ ). El CD3 $\epsilon$  humano está descrito en UniProt P07766 (CD3E\_HUMAN). Un anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  descrito en el estado de la técnica es SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100). SP34 reacciona con ambos CD3, el de primates y el de humanos. SP3 está disponible en PharMingen. Otro anticuerpo anti-CD3 descrito en el estado de la técnica es UCHT-1 (ver WO2000041474). Otro anticuerpo anti-CD3 descrito en el estado de la técnica es BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; usado en la Fase I/II de los ensayos clínicos de GvHD, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)).

Una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes se han desarrollado en el pasado reciente, por ej., mediante la fusión de por ej., un anticuerpo con formato IgG y los dominios de una cadena (ver Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16). Los anticuerpos biespecíficos en donde los dominios variables VL y VH o los dominios constantes CL y CH se reemplazaron unos por otros se describen en WO2009080251 y WO2009080252.

Una aproximación para evitar el problema de los productos mal apareados, es la llamada “botón en ojal” que tiene como objetivo forzar el apareamiento de dos cadenas pesadas diferentes de anticuerpo mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar el contacto con la interfase. En una cadena se reemplazan los aminoácidos voluminosos por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un “ojal”. A la inversa, los aminoácidos con cadenas laterales grandes se introducen en el otro dominio CH3, para crear un “botón”. Mediante la co-expresión de estas dos cadenas pesadas (y de dos cadenas livianas idénticas, que deben ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se observó que se forman en altos rendimientos los heterodímeros (“botón-ojal”) versus los homodímeros (“ojal-ojal” o “botón-botón”) (Ridgway JB, Presta LG, Carter P; Proteína Eng. 9, 617-621 (1996); y WO1996027011). El porcentaje de heterodímeros puede ser adicionalmente aumentado mediante el remodelado de las superficies de interacción de los dos dominios CH3 utilizando la tecnología de phage display y mediante la introducción de un puente disulfuro para estabilizar a los heterodímeros (Merchant A.M, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35). Las nuevas aproximaciones de la tecnología de “botón en ojal” están descritas en por ej., EP 1870459A1. Aunque este formato parece ser muy atractivo, no existen datos disponibles que describan su progresión a la clínica. Una limitación importante de esta estrategia es que las cadenas livianas de los dos anticuerpos parentales tienen que ser idénticas

para prevenir el apareamiento erróneo y la formación de moléculas inactivas. Por consiguiente, esta técnica no es apropiada para desarrollar fácilmente anticuerpos biespecíficos recombinantes contra dos blancos, a partir de dos anticuerpos contra el primer y segundo blanco, ya sea que tengan que ser optimizadas las cadenas pesadas de estos anticuerpos y/o las cadenas livianas idénticas. Xie, Z., et al, *J Immunol Methods* 286 (2005) 95-101 se refieren a un formato de anticuerpo biespecífico usando scFvs en combinación con la tecnología de "botón en ojal" para la porción Fc. WO2012116927 y WO2010145792 mencionan el intercambio de los dominios CH1 y CL. WO2009080254 menciona las construcciones de botón en ojal para producir los anticuerpos biespecíficos. WO 2006093794 se refiere a las composiciones para la unión de proteínas heterodiméricas. WO199937791 describe derivados de anticuerpos multi-propósito. Morrison, S.L., et al., *J. Immunol.* 160 (1998) 2802-2808 se refieren a la influencia del intercambio del dominio de la región variable en las propiedades funcionales de la IgG.

WO 201302362 se refiere a los polipéptidos heterodimerizados. WO201312733 se refiere a los polipéptidos que comprenden a regiones Fc heterodiméricas. WO2012131555 se refiere a inmunoglobulinas heterodiméricas obtenidas por ingeniería. EP 2647707 se refiere a inmunoglobulinas heterodiméricas obtenidas por ingeniería. WO2009080251, WO 2009080252, WO 2009080253, WO 2009080254 y Schaefer, W. et al, *PNAS*, 108 (2011) 11187-1191 se refieren a anticuerpos IgG biespecíficos bivalentes con un entrecruzamiento en sus dominios. Los anticuerpos multiespecíficos con un reemplazo/intercambio VH/VL en un sitio de unión para prevenir el mal apareamiento de las cadenas livianas (CrossMabVH-VL) están descritos en WO2009080252, (ver también Schaefer, W. et al, *PNAS*, 108 (2011) 11187-1191) y claramente reducen los subproductos causados por el mismatch de una cadena liviana contra un primer antígeno con la cadena pesada incorrecta contra el segundo antígeno (en comparación con otras aproximaciones sin tales intercambios en los dominios). Sin embargo, la preparación de estos no está completamente libre de la formación de los productos no deseados. El principal producto no deseado está basado en la interacción tipo Bence-Jones (Schaefer, W. et al, *PNAS*, 108 (2011) 11187-1191).

Los anticuerpos contra BCMA están descritos por ej., en Gras M-P. et al. *Int Immunol.* 7 (1995) 1093-1106, WO200124811, WO200124812, WO2010104949 y WO2012163805. Los anticuerpos contra BCMA y su uso en el tratamiento de los linfomas y del mieloma múltiple están mencionados por ej., en WO2002066516 y WO2010104949. WO2013154760 se refiere a los receptores antigénicos quiméricos (CAR) que comprenden a un motivo que reconoce al BCMA y a un motivo que activa a las células T.

Ryan, MC et al., *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 3009-3018 se refieren al uso del BCMA como blanco para las neoplasias malignas de las células plasmáticas. El anticuerpo SG1, con actividad de ligando bloqueante pudo promover la citotoxicidad de líneas celulares de mieloma múltiple (MM) como anticuerpo desnudo o como anticuerpo conjugado con drogas (ADC). SG1, es un anticuerpo que inhibe al BCMA, y bloquea in vitro la activación del factor nuclear  $\kappa$ B dependiente de APRIL de manera dependiente de la dosis. Se evaluó la citotoxicidad del SG1 como anticuerpo desnudo después de la quimerización con y sin mutaciones en el Fc para aumentar su unión al Fc $\gamma$ RIIIA. Ryan también menciona al anticuerpo SG2, el cual no inhibe significativamente la unión de APRIL al BCMA. Sin embargo, SG2 mostró un valor de IC<sub>50</sub> 20 veces más alto como SG1 medido como actividad citotóxica de un conjugado de la droga contra las líneas celulares de mieloma BCMA-positivas. Ryan concluye que los anticuerpos BCMA pueden actuar sobre las líneas celulares de mieloma múltiple mediante múltiples mecanismos que incluyen la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de APRIL, la promoción de la lisis de las células tumorales mediante la actividad ADCC de las células natural killer, y mediante la inducción de la citotoxicidad por ADC.

Los anticuerpos biespecíficos contra CD3 y BCMA están mencionados en WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058, WO2012143498, y WO2013072415. WO2014122143 y WO2014122144 describen a los anticuerpos contra BCMA y a los anticuerpos biespecíficos contra CD3 y BCMA que comprenden ciertas CDR y ciertos dominios variables descritos también en la presente invención.

En consecuencia, existe una necesidad de anticuerpos biespecíficos contra CD3 $\epsilon$  y BCMA con intercambios VH/VL que se puedan producir en altos rendimientos y purificarse fácilmente.

**Sumario de la Invención**

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos blancos que son el dominio extracelular del BCMA humano (también llamado "BCMA") y el CD3ε humano (también llamado "CD3"), que se caracteriza por comprender a

- 5 a) la primera cadena liviana y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA; y
- b) la segunda cadena liviana y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente al CD3, y en donde los dominios variables VL y VH en la segunda cadena liviana y en la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo son sustituidos uno por otro; y
- 10 c) en donde en el dominio constante CL de la primera cadena liviana en a) el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D).
- 15 Preferentemente, dicho anticuerpo biespecífico descrito en el párrafo precedente comprende además un fragmento Fab de dicho primer anticuerpo (también llamado "BCMA-Fab") y en el dominio constante CL de dicho BCMA-Fab el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de dicho BCMA-Fab el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat) (ver por ej., Figuras 2A, 2C).
- 20

La invención también se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos blancos que son el dominio extracelular del BCMA humano (también llamado "BCMA") y el CD3ε (también llamado "CD3"), que se caracterizan por comprender a

- 25 a) la primera cadena liviana y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA; y
- b) la segunda cadena liviana y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente al CD3, y en donde los dominios variables VL y VH en la segunda cadena liviana y en la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo son sustituidos uno por otro; y en donde
- 30 c) en el dominio constante CL de la segunda cadena liviana en b) el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat) (ver por ej., Figuras 1B, 2B, 2D, 3B, 3D).
- 35 Preferentemente, dicho anticuerpo biespecífico descrito en el párrafo precedente está también caracterizado porque comprende además un segundo fragmento Fab de dicho primer anticuerpo ("BCMA-Fab") (ver ej., Figuras 2B, 2D).

La numeración de los aminoácidos es de acuerdo con Kabat (ver más abajo).

Preferentemente, además de la sustitución aminoacídica en la posición 124 en el dominio constante (CL) de la primera o segunda cadena liviana, el aminoácido en la posición 123 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

5 Preferentemente en el dominio constante CL el aminoácido en la posición 124 es sustituido por lisina (K), en el dominio constante CH1 el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos por el ácido glutámico (E). Preferentemente, además en el dominio constante CL el aminoácido en la posición 123 es sustituido por arginina (R).

10 En una realización preferida de la invención el anticuerpo de acuerdo con la invención consiste en un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente al CD3 (posteriormente denominado también como "CD3-Fab"), y un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente al BCMA (posteriormente denominado también como "BCMA-Fab(s)") y una porción Fc, en donde el CD3-Fab y el BCMA-Fab están unidos vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc. El CD3-Fab o el BCMA-Fab comprende una sustitución aa y el CD3-Fab comprende un entrecruzamiento (Figuras 1A y 1B).

15 En una realización preferida de la invención el anticuerpo de acuerdo con la invención, consiste en un CD3-Fab, y un BCMA-Fab y una porción Fc, en donde el CD3-Fab y el BCMA-Fab están unidos vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y un segundo BCMA-Fab, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal del CD3-Fab comprende a un entrecruzamiento, y el CD3-Fab o ambos BCMA-Fab comprenden a una sustitución aa (Figuras 2A y 2B). Especialmente preferido es un anticuerpo biespecífico que comprende al BCMA-Fab-Fc-CD3-BCMA-Fab-Fab, en donde ambos BCMA-Fabs comprenden a una sustitución aa y el CD3-Fab comprende a un entrecruzamiento VL/VH (Figuras 2A). Especialmente preferido es un anticuerpo biespecífico que consiste en BCMA-Fab-Fc-CD3-BCMA-Fab-Fab, en donde ambos BCMA-Fabs comprenden la sustitución aa Q124K, E123R, K147E y el CD3-Fab comprende a un entrecruzamiento VL/VH. Especialmente preferido es que ambos BCMA-Fab comprendan como CDR a las CDR del anticuerpo 83A10, o como VH/VL al VH/VL del 83A10. Adicionalmente preferido es que ambos BCMA-Fab comprendan como CDR a las CDR del anticuerpo 17A5, o como VH/VL al VH/VL del 17A5. Adicionalmente preferido es que ambos BCMA-Fabs comprendan como CDR a las CDR del anticuerpo 13A4, o como VH/VL al VH/VL del 13A4.

25 En una realización preferida de la invención el anticuerpo de acuerdo con la invención consiste en dos BCMA-Fab y una porción Fc, en donde los BCMA-Fab están unidos vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y una Fab-CD3, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal de un BCMA-Fab. El Fab-CD3 comprende a un entrecruzamiento, y el Fab-CD3 o ambos BCMA-Fab comprenden a una sustitución aa (Figuras 2C y 2D).

En una realización preferida de la invención el anticuerpo de acuerdo con la invención consiste en un Fab-CD3, que está unido vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y un BCMA-Fab, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal del Fab-CD3. El Fab-CD3 comprende a un entrecruzamiento y el Fab-CD3 o el BCMA-Fab comprenden a una sustitución aa (Figuras 3A y 3B).

35 En una realización preferida de la invención el anticuerpo de acuerdo con la invención consiste en un BCMA-Fab, que está unido vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y un Fab-CD3, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal del BCMA-Fab. El Fab-CD3 comprende a un entrecruzamiento y el Fab-CD3 o el BCMA-Fab comprenden a una sustitución aa (Figuras 3C y 3D).

40 Los fragmentos Fab están químicamente unidos mediante el uso de un linker apropiado de acuerdo con el estado de la técnica. Preferentemente se usó un linker (Gly4-Ser1) (Desplancq DK et al., *Proteína Eng.* 1994 Aug;7(8):1027-33 y Mack M. et al., *PNAS* July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). La unión entre los dos fragmentos Fab se realizó entre las dos cadenas pesadas. Por consiguiente, el C-terminal del CH1 del primer fragmento Fab está unido al N-terminal del VH del segundo fragmento (sin entrecruzamiento) o al VL (con entrecruzamiento). La unión entre un fragmento Fab y la porción Fc se realizó de acuerdo con la invención como una unión entre el CH1 y el CH2.

45 El primer y segundo fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente al BCMA son preferentemente derivados del mismo anticuerpo y preferentemente idénticos en sus secuencias CDR, en sus secuencias de los

dominios variables VH y VL y/o en sus secuencias de los dominios constantes CH1 y CL. Preferentemente las secuencias aminoacídicas del primer y segundo fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente al BCMA son idénticas. Preferentemente el anticuerpo BCMA es un anticuerpo que comprende a las secuencias CDR del anticuerpo 83A10, 17A5 o 13A4, un anticuerpo que comprende a las secuencias VH y VL del anticuerpo 83A10, 17A5 o 13A4, o un anticuerpo que comprende a las secuencias VH, VL, CH1, y CL del anticuerpo 83A10, 17A5 o 13A4.

Preferentemente el anticuerpo biespecífico comprende como fragmentos Fab y porción Fc, no más de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3, no más de dos fragmentos Fab de un anticuerpo anti-BCMA y no más de una porción Fc, preferentemente una porción Fc humana. Preferentemente, el segundo fragmento Fab de un anticuerpo anti-BCMA está unido mediante su C-terminal al N-terminal del fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 o a la región bisagra de la porción Fc. Preferentemente la unión se realizó entre el CH1 del BCMA-Fab y el VL del CD3-Fab (entrecruzamiento VL/VH).

Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención es adicionalmente caracterizado porque se une específicamente también al BCMA de cynomolgus. Tal anticuerpo preferido de acuerdo con la invención es el anticuerpo caracterizado porque comprende a un set de polipéptidos de cadenas pesadas y livianas de SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, y SEQ ID NO:46 (set 1).

Preferentemente la porción del anticuerpo que se une específicamente al CD3 humano, preferentemente al fragmento Fab, es caracterizado porque comprende al dominio variable VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas, y un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas livianas, del anticuerpo anti CD3 $\epsilon$  (CDR MAB CD3). Preferentemente la porción del anticuerpo que se une específicamente al CD3 humano es caracterizado porque los dominios variables son de SEQ ID NO:7 y 8 (VHVL MAB CD3).

Preferentemente la porción del anticuerpo, preferentemente el fragmento Fab, que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un dominio variable VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas CDR1H de SEQ ID NO:21, una CDR2H de SEQ ID NO:24, una CDR3H de SEQ ID NO: 27 y porque comprende a un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas CDR1L de SEQ ID NO:30, una CDR2L de SEQ ID NO:33, una CDR3L de SEQ ID NO: 36 (CDR MAB 83A10). Preferentemente la porción del anticuerpo, preferentemente el fragmento Fab, que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un dominio variable VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas CDR1H de SEQ ID NO:23, una CDR2H de SEQ ID NO:26, una CDR3H de SEQ ID NO: 29 y un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas CDR1L de SEQ ID NO:32, una CDR2L de SEQ ID NO:35, una CDR3L de SEQ ID NO: 38 (CDR MAB 13A4).

Preferentemente la porción del anticuerpo, preferentemente el fragmento Fab, que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un VH de SEQ ID NO: 15 y a un VL de SEQ ID NO: 18 (VHVL MAB 83A10). Preferentemente la porción del anticuerpo, preferentemente el fragmento Fab, que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un VH de SEQ ID NO: 16 y a un VL de SEQ ID NO: 19 (VHVL MAB 17A5). Preferentemente la porción del anticuerpo, preferentemente el fragmento Fab, que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un VH de SEQ ID NO: 17 y a una VL de SEQ ID NO: 20 (VHVL MAB 13A4).

La invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al dominio extracelular del BCMA humano y al CD3 $\epsilon$  humano, caracterizado porque comprende un set de cadenas pesadas y livianas seleccionado entre el grupo constituido por los polipéptidos

i) SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, y SEQ ID NO:46(set 1),

ii) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, y SEQ ID NO:49 (set 2), y

iii) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, y SEQ ID NO:52 (set 3).

5 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende como anticuerpo anti-BCMA a un anticuerpo seleccionado entre el grupo de variantes del anticuerpo BCMA 13A4 y 83A10. Preferentemente, un anticuerpo de la invención comprende a las secuencias del anticuerpo13A4, comprende a una sustitución aminoacídica en la respectiva posición 95 (N95) o 96 (G96) dentro de la CDR3H de SEQ ID NO:29 ya sea mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 95, ya sea, N95S, N95T, N95E, N95Q, N95A, o N95G, o mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 96, ya sea G96A, G96E, o G96Q.

10 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4, comprende a una sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas en las respectivas posiciones 27 (N27f) y 28 (G28) dentro de la CDR1L de SEQ ID NO:32, ya sea mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 27, ya sea N27fS, N27fT, N27fE, N27fQ, N27fA, o N27fG o mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 28 ya sea G28A, G28E, o G28Q.

15 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4, comprende a una sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas en las respectivas posiciones 54 (D54) y 55 (S55) dentro de la CDR2H de SEQ ID NO:26 ya sea mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 54, ya sea D54S, D54T, D54E, D54Q, D54A, o D54G o mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 55, ya sea S55A, S55E, o S55Q.

20 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4, comprende a una sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas W en la posición 33 (W33) dentro de la CDR1H de SEQ ID NO:23 ya sea W33F, W33Y, W33V, W33I, W33L, o W33A.

25 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4, comprende hasta dos sustituciones aminoacídicas en N95 y/o W33 o hasta dos sustituciones aminoacídicas en G96 y/o W33. Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4, comprende una sustitución aminoacídica en N95 o G96.

30 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4, comprende hasta cuatro sustituciones aminoacídicas en N95 y/o W33 y/o N27 o G28 y/o D54 o S55o hasta cuatro sustituciones aminoacídicas en G96 y/o W33 y/o N27 o G28 y/o D54 o S55. Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4, comprende una sustitución aminoacídica en N95 o G96.

35 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende a la primera cadena liviana y a la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA, en donde dicha cadena liviana comprende como CDR a CDR2L de SEQ ID NO:35, CDR3L de SEQ ID NO: 38 y CDR1L seleccionadas entre el grupo constituido por SEQ ID NO: 32,71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, y 87, y en donde dicha cadena pesada comprende como CDR de las cadenas pesadas a CDR1H seleccionada entre el grupo constituido por SEQ ID NO:23, 107, 109, 111, 113, 115, y 117, CDR2H seleccionada entre el grupo constituido por SEQ ID NO:26, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, y 105, CDR3H seleccionada entre el grupo constituido por SEQ ID NO:29, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, y 69.

40 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende dentro de la primera cadena liviana de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA, un dominio variable de la cadena liviana VL seleccionado entre el grupo constituido por SEQ ID NO:20, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, y 88, y dentro de la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA un dominio variable de la cadena pesada VH seleccionado entre el grupo constituido por SEQ ID NO:17, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, y 118.

Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende a las secuencias del anticuerpo 83A10, comprende a una sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas en la posición 98 (W98) dentro de la CDR3H de SEQ ID NO:27 ya sea W98F, W98Y, W98V, W98I, W98L, o W98A.

5 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende a una primera cadena liviana y a una primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA, en donde dicha cadena liviana comprende como CDR a CDR1L de SEQ ID NO:30, CDR2L de SEQ ID NO:33, CDR3L de SEQ ID NO: 36 y dicha cadena pesada comprende como CDR de las cadenas pesadas a CDR1H de SEQ ID NO:21, CDR2H de SEQ ID NO:24, y CDR3H seleccionada entre el grupo constituido por SEQ ID NO: 27, 119, 121, 123, 125, 127, y 129.

10 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende dentro de la primera cadena liviana de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA un dominio variable de la cadena liviana VL de SEQ ID NO:18 y dentro de la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA un dominio variable de la cadena pesada VH seleccionado entre el grupo constituido por SEQ ID NO: 15, 120, 122, 124, 126, 128, y 130.

15 La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al dominio extracelular del BCMA y al CD3 $\epsilon$ , caracterizado porque comprende como cadenas pesadas y cadenas livianas a los polipéptidos de SEQ ID NO: 45, 50, 51, y 52 en donde una o más CDR son reemplazadas por las respectivas CDR de las "variantes del anticuerpo BCMA". La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular del BCMA y al CD3 $\epsilon$ , caracterizado porque comprende como cadenas pesadas y livianas a los polipéptidos de SEQ ID NO: 45, 50, 51, y 52 en donde uno o más VH y/o VL son reemplazados por los respectivos VH y/o VL de las "variantes del anticuerpo BCMA". La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular del BCMA y al CD3 $\epsilon$ , caracterizado porque comprende como cadenas pesadas y livianas a los polipéptidos de SEQ ID NO: 43, 44, 45, y 46 en donde una o más CDR son reemplazadas por las respectivas CDR de las "variantes del anticuerpo BCMA". La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular del BCMA y al CD3 $\epsilon$ , caracterizado porque comprende como cadenas pesadas y livianas a los polipéptidos de SEQ ID NO: 43, 44, 45, y 46 en donde una o más VH y/o VL son reemplazadas por los respectivos VH y/o VL de las "variantes del anticuerpo BCMA". Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención muestra una alta afinidad por el BCMA y baja agregación.

30 La invención también se refiere a un set de ácidos nucleicos que codifican a un set respectivo de cadenas pesadas y livianas.

Preferentemente el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende a las regiones constantes pesadas CH2/CH3 de la subclase IgG1 es caracterizado porque comprende las mutaciones L234A, L235A y P239G (numeración de acuerdo con Kabat) para evitar la unión al FcR y al C1q y minimizar la ADCC/CDC. La ventaja es que tal anticuerpo de la invención media la eficacia de la muerte de las células tumorales puramente mediante el poderoso mecanismo de redireccionamientos/activación de las células T. Otros mecanismos de acción adicionales como los efectos sobre el sistema de complemento y sobre las células efectoras que expresan FcR se evitaron y el riesgo de efectos colaterales se disminuyó.

40 La invención comprende preferentemente una cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la invención constituida por (del N-al-C-terminal) VH(BCMA)-CH1(BCMA)-VL(CD3)-CH1(CD3)-CH2-CH3 de SEQ ID NO:43, 47, o 50, como así también a los respectivos ácidos nucleicos codificantes. Estos polipéptidos y los respectivos ácidos nucleicos son útiles para la producción de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención.

45 Los intercambios de aminoácidos (aa) por fuera de las CDR de los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención proporcionan una mejora considerable en la producción/purificación sin cambiar las propiedades biológicas como ser la unión al BCMA. Mediante la introducción de los cambios aa de acuerdo con la invención, los apareamientos erróneos de las cadenas livianas LC y la formación de productos no deseados durante la producción se redujeron significativamente y por consiguiente se facilitó la purificación.



Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado por presentar una inhibición del crecimiento del tumor en más de un 70%, preferentemente en más de un 85%, preferentemente cerca de un 100% en un modelo de injerto de mieloma múltiple (por ej., injerto con las células NCI-H929 o RPMI8226 o U266B1 o L-363) a una dosis de 1mg/kg de peso corporal (BW) administrado por vía intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.) dos veces por semana o una vez por semana, preferentemente 0,5 mg/kg de BW administrado por vía i.v. o i.p. o s.c. dos veces por semana o una vez por semana, preferentemente 0,1 mg/kg de BW administrado por vía i.v. o i.p. o s.c. dos veces por semana o una vez por semana, preferentemente 0,05 mg/kg de BW administrado por vía i.v. o i.p. o s.c. dos veces por semana o una vez por semana, preferentemente 0,01mg/kg de BW administrado por vía i.v. o i.p. o s.c. dos veces por semana o una vez por semana, preferentemente 5µg/kg de BW administrado por vía i.v. o i.p. o s.c. dos veces por semana o una vez por semana.

Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado por una vida media de eliminación en ratones, preferentemente en monos cynomolgus es mayor de 24 horas, preferentemente 3 días o más, preferentemente la vida media se midió por las dosis que son efectivas en el modelo de injerto cuando se administran dos veces o una vez por semana.

Los anticuerpos biespecíficos que se unen a un blanco en las células tumorales y al CD3 y que tienen el formato molecular (scFv)<sub>2</sub> tienen una vida media de eliminación corta de 1 a 4 horas. En los ensayos clínicos con el anticuerpo biespecífico (scFv)<sub>2</sub> CD19xCD3 blinatumomab, este compuesto tuvo que ser administrado vía una bomba llevada por los pacientes por semanas y meses (Topp et al. J Clin Oncol 2011; 29(18): 2493-8). En comparación con la administración de dos veces por semana o una vez por semana por vía iv o sc, el tratamiento administrado mediante una bomba es menos conveniente para los pacientes y es también mucho más riesgoso (por ej., fallas en la bomba, problemas con el catéter).

Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque tiene un valor de EC50 de unión a las células NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) de 30 nM o menor, preferentemente un valor de EC50 de 15 nM y menor.

Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado por su capacidad de inducir la muerte redirigida de las células tumorales NCI-H929 en presencia de células T humanas con un EC50 menor a 0,1 nM, preferentemente 0,05 nM, preferentemente 0,02 nM, preferentemente 0,002 nM y menor.

Preferentemente la potencia para matar de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención no es reducida o es mínimamente reducida por las concentraciones clínicamente relevantes de APRIL; específicamente el anticuerpo biespecífico de la invención es caracterizado porque la adición de 100 ng/ml de APRIL modifica el EC50 para inducir la muerte redirigida por parte de las células T a las células tumorales por menos de un factor de 4, preferentemente por menos de un factor de 2, preferentemente por menos de un factor de 1,5. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico de la invención es caracterizado porque la adición de 1.000 ng/mL de APRIL modifica el EC50 para inducir la muerte redirigida por parte de las células T a las células tumorales por menos de un factor de 6,5, preferentemente por menos de un factor de 5, preferentemente por menos de un factor de 4, preferentemente por menos de un factor de 3, preferentemente por menos de un factor de 2.

APRIL y BAFF han demostrado ser importantes en la patogénesis del mieloma múltiple. Los pacientes que sufren de mieloma múltiple presentan una alta variabilidad en las concentraciones plasmáticas de APRIL y BAFF. En los sujetos sanos, las concentraciones plasmáticas de APRIL son usualmente de 10 ng/ml o menor. En los pacientes con mieloma, las concentraciones plasmáticas de APRIL y/o BAFF están dentro del rango de 10 ng/ml a 100 ng/ml y en un bajo porcentaje de los pacientes incluso hasta 300 ng/ml y más (Moreaux et al. 2004; Blood 103(8): 3148-3157). Más importante, APRIL se encuentra constitutivamente expresado en el microambiente de la médula ósea y es un factor de supervivencia importante de las células malignas de mieloma y es principalmente producida y secretada por las células precursoras mieloides de la médula ósea (Matthes et al. Blood 2011; 118(7):1838-1844). Por consiguiente, las concentraciones de APRIL en la médula ósea de los pacientes con mieloma, las cuales se esperan sean de alta magnitud, hasta 1.000 ng/mL o incluso más, son relevantes en este contexto. Si las concentraciones de la muerte redirigida por parte de las células T a las células tumorales por un anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 son por ej., desplazadas por 100 ng/ml y/o 1.000 ng/mL de APRIL a concentraciones significativamente más altas (es decir, si se usan altas concentraciones del anticuerpo biespecífico para lograr el mismo valor de lisis del tumor (%) en un tiempo definido de incubación) a una determinada dosis/concentración

clínica del anticuerpo biespecífico, los pacientes con bajos niveles de APRIL en sangre y/o médula ósea van a tener un efecto terapéutico, pero pacientes con por ej., 100 ng/ml de APRIL en sangre y/o 1.000 ng/mL de APRIL en médula ósea van a responder con un efecto terapéutico mucho menor o incluso no van a tener ningún efecto terapéutico con el tratamiento con el anticuerpo biespecífico. Una alternativa podría ser el uso de altas dosis terapéuticas, pero en tal caso, los riesgos de presentar efectos colaterales aumentarían considerablemente (los anticuerpos biespecíficos de células T pueden estar asociados con efectos colaterales dosis-dependientes, por ej, como se documentó para el blinatumomab en las fases 1 y 2 de los ensayos clínicos). Tales desplazamientos hacia concentraciones efectivas más altas del anticuerpo BCMAxCD3 por los altos niveles de APRIL podrían más probablemente ser causados si el anticuerpo BCMAxCD3 y el ligando APRIL compiten por los mismos sitios de unión del receptor BCMA. En ese caso, la ocupación del receptor BCMA podría estar reducida al competir con APRIL. Una menor ocupación del receptor con el anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 significa una menor eficacia. BAFF también podría producir tal desplazamiento, pero dada la menor afinidad de unión de BAFF al BCMA que APRIL al BCMA (es decir, una afinidad de hasta 1.000 veces menor), las concentraciones plasmáticas de APRIL son en este contexto más relevantes que las concentraciones plasmáticas de BAFF.

15 Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención no compete con un ligando natural por la unión al BCMA, preferentemente, no con APRIL.

20 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque la unión de dicho anticuerpo al BCMA humano a una concentración de 1.000 nM no disminuyó con 140 ng/ml (6,25nM) de  $\Delta$  APRIL murina en más de un 10%, medido en un ensayo de ELISA como DO a 450 nm, en comparación con la unión de dicho aglutinante/anticuerpo al BCMA humano sin APRIL.

25 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque la unión de dicho anticuerpo al BCMA humano a una concentración de 500nM no disminuyó con 1.120 ng/ml (50nM) de  $\Delta$ APRIL en más de un 35%, preferentemente no disminuyó en más de un 15% medido en un ensayo de ELISA como DO a 450 nm en comparación con la unión de dicho aglutinante/anticuerpo al BCMA humano sin APRIL. Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque la unión de dicho aglutinante/anticuerpo al BCMA humano a una concentración de 1.000nM no disminuyó con 1.120 ng/ml (50nM) de  $\Delta$  APRIL en más de un 35%, preferentemente no disminuyó en más de un 15% medido en un ensayo de ELISA como DO a 450 nm en comparación con la unión de dicho aglutinante/anticuerpo al BCMA humano sin APRIL.

30 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque la unión de dicho anticuerpo al BCMA de la línea celular de mieloma múltiple NCI-H929 no disminuyó en presencia de APRIL en más de un 25%, preferentemente en no más de un 20%, preferentemente en no más de un 10%, medida como la unión de dicho aglutinante/anticuerpo a una concentración de 200nM, preferentemente 100nM, preferentemente 50nM, y preferentemente 5nM a las células NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) en presencia de APRIL a una concentración de 2,5 $\mu$ g/ml en comparación con la unión de dicho anticuerpo a las células NCI-H929 sin APRIL.

35 Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque dicho anticuerpo no altera (induce o reduce) la activación de NF- $\kappa$ B inducida por APRIL (concentración de APRIL 1.000 ng/mL) a una concentración de 1nM, preferentemente 100nM, preferentemente 400nM por más del 30%, preferentemente no altera más del 20%, preferentemente no altera más del 10% en comparación con APRIL solo, y/o dicho anticuerpo no induce la activación de NF- $\kappa$ B sin APRIL a una concentración de 1nM, preferentemente de 100nM, 40 preferentemente de 400nM por más del 20%, preferentemente por no más del 10%, preferentemente por no más del 5% en comparación sin dicho anticuerpo.

45 La estabilidad de los anticuerpos biespecíficos puede afectarse en las condiciones prácticas y en las aplicaciones clínicas. A pesar de las recientes mejoras en la ingeniería de los anticuerpos, algunas proteínas recombinantes y formatos moleculares (por ej., fragmentos scFVs) tienden a desnaturalizarse y formar agregados más fácilmente que otros bajo condiciones de stress (Worn and Pluckthun. J Mol Biol 2001; 305, 989-1010). Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque dicho anticuerpo guardado en un formulación buffer estándar a 37°C preferentemente a 40°C, por 10 días, preferentemente hasta 2 semanas, preferentemente hasta 4 semanas, no resulta en más de un 10% de cambios ( $\Delta$ ), preferentemente no más de un 5% de cambios ( $\Delta$ ), en especies de alto peso molecular (HMW) y/o en especies de bajo peso molecular (LMW) y/o contenido de

monómeros en comparación con dicho anticuerpo guardado en el mismo buffer de formulación a -80°C por el mismo período de almacenamiento.

5 Preferentemente un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es caracterizado porque induce la muerte redirigida de cultivos primarios de células de mieloma provenientes de un paciente con mieloma múltiple en presencia de células T humanas. Preferentemente, el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención es caracterizado porque el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se juntan en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo; en donde dicha interfase está alterada para promover la formación del anticuerpo biespecífico, en donde la alteración está caracterizada porque:

10 a) el dominio CH3 de una cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original el dominio CH3 de una cadena pesada que se junta con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral de volumen más grande, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se posiciona en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada y

15 b) el dominio CH3 de la otra cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que se junta con la interfase original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral de volumen más pequeño, generando una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro de la cual se posiciona una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

20 Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque dicho residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral con volumen mayor es seleccionado entre el grupo constituido por arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque dicho residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral con volumen menor es seleccionado entre el grupo constituido por alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V). Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque ambos dominios CH3 están adicionalmente alterados mediante la introducción de una cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3. Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque uno de los dominios constantes de la cadena pesada CH3 de ambas cadenas pesadas se reemplazó por un dominio constante de la cadena pesada CH1; y el otro dominio constante de la cadena pesada CH3 se reemplazó por un dominio constante de la cadena liviana CL.

30 Preferentemente el anticuerpo de acuerdo con la invención es adicionalmente caracterizado porque se une también específicamente al BCMA de cynomolgus.

Una realización adicional de la invención es uno o más ácidos nucleicos que codifican para las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

35 Otras realizaciones adicionales de la invención son los vectores de expresión que comprenden a los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención capaces de expresar dicho ácido nucleico en una célula hospedera.

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que comprende a las etapas de

- a) transformar una célula hospedera con vectores que comprenden a moléculas de ácido nucleico que codifican para las cadenas livianas y las cadenas pesadas de un anticuerpo de acuerdo con esta invención,
- 40b) cultivar la célula hospedera bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
- c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

Una realización adicional de la invención es una célula hospedera que comprende a los vectores que comprenden a las moléculas de ácido nucleico que codifican para las cadenas livianas y las cadenas pesadas de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

5 Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una realización adicional de la invención es una composición diagnóstica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con la invención

Una revelación es un método para el tratamiento de un paciente que necesita terapia, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención.

10 Una realización preferida de la invención es una composición farmacéutica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento. Una realización adicionalmente preferida de la invención es una composición farmacéutica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento para el tratamiento de desórdenes de las células plasmáticas. Una realización adicionalmente preferida de la invención es una composición farmacéutica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento para el tratamiento del mieloma múltiple. Una realización adicionalmente preferida de la invención es un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de desórdenes de las células plasmáticas como el mieloma múltiple u otros desórdenes de las células B en donde se exprese el BCMA. El mieloma múltiple es una enfermedad maligna de las células B caracterizado por una expansión monoclonal de células plasmáticas anormales en el compartimento de la médula ósea. El mieloma múltiple también involucra a los clones de células B que están en circulación que presentan el mismo reordenamiento de los genes de la IgG y la misma hipermutación somática. El mieloma múltiple surge a partir de una condición pre-maligna asintomática denominada gammapatía monoclonal de significado desconocido (MGUS), caracterizada por la presencia de bajos niveles de células plasmáticas de médula ósea y de una proteína monoclonal. Las células del mieloma múltiple proliferan a baja velocidad. El mieloma múltiple resulta de la ocurrencia progresiva de múltiples cambios estructurales cromosómicos (por ej., translocaciones desequilibradas). El mieloma múltiple implica la interacción mutua de las células plasmáticas malignas y el microambiente de la médula ósea (por ej., células normales del estroma de la médula ósea). Los signos clínicos de un mieloma múltiple activo incluyen pico de anticuerpos monoclonales, superpoblación de la médula ósea con células plasmáticas, lesiones líticas a nivel óseo y destrucción ósea resultantes de la sobre-estimulación de los osteoclastos (Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl 7: vii143-150). Otro desorden de las células B que involucra a las células plasmáticas, es decir, que expresan BCMA es el lupus eritematoso sistémico (SLE), también conocido como lupus. El SLE es una enfermedad autoinmune sistémica que puede afectar cualquier parte del cuerpo y está representado por el sistema inmune que ataca a las propias células y tejidos del organismo, lo cual resulta en una inflamación crónica y un daño tisular. Es una reacción de hipersensibilidad de tipo III en la cual los complejos inmunes precipitan y causan una respuesta inmune (Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337). Una revelación adicional es una composición farmacéutica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico.

### **Descripción de las Figuras**

40 Figura 1. Anticuerpos biespecíficos bivalentes que comprenden solamente a los fragmentos Fab s (específicos para CD3 y BCMA) y la porción Fc tal como se especifica: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3; (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE). Sustituciones aa para RK/EE introducidas en CL-CH1 para reducir el apareamiento erróneo entre LC o los productos no deseados durante la producción. El Fab CD3 incluye al entrecruzamiento VL-VH para reducir el apareamiento erróneo entre LC y los productos no deseados.

45 Figura 2. Anticuerpos biespecíficos trivalentes preferidos que comprenden solo los fragmentos Fab (específicos para CD3 y BCMA) y la porción Fc tal como se especifica: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). Sustituciones aa para RK/EE introducidas en CL-CH1 para reducir el apareamiento erróneo entre LC o los productos no deseados durante la producción. Preferentemente, el Fab CD3

incluye a un entrecruzamiento VL-VH para reducir el apareamiento erróneo entre LC y los productos no deseados. Preferentemente, el Fab CD3 y el Fab BCMA están unidos entre sí por medio de linkers flexibles.

5      Figura 3. Anticuerpos biespecíficos bivalentes que comprenden solamente a los fragmentos Fab s (específicos para CD3 y BCMA) y la porción Fc tal como se especifica: (A) Fc-Fab CD3-Fab BCMA (RK/EE); (B) Fc-Fab CD3 (RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). Preferentemente, el Fab CD3 incluye a un entrecruzamiento VL-VH para reducir el apareamiento erróneo entre LC y los productos no deseados. El Fab CD3 y el Fab BCMA están unidos entre sí por medio de linkers flexibles

10      Figura 4. Unión de los anticuerpos anti-BCMA a las células de mieloma múltiple BCMA-positivas. Intensidad media de fluorescencia para los clones de IgG anti-BCMA graficada en función de la concentración del anticuerpo anti-BCMA (de 0,2 a 40 µg/mL); (A) clones 17A5 y 83A10 en las células H929, (B) clones 17A5, 83A10 en las células MKN45, (C) clones 13A4 en las células H929 (D) clones 13A4 en las células MKN45 (ver Ejemplo 4).

15      Figura 5. ELISA competitivo. Se muestran los resultados del ELISA de los clones seleccionados del Fab anti-BCMA (17A5, 83A10, y 13A4), a concentraciones saturantes de 500 o 1.000 nM, y la unión al BCMA humano inmovilizado en presencia de un rango de concentración de APRIL murina (de 1,56 a 100 nM). En los casos de no competencia, las señales permanecieron constantes dentro de la variabilidad del ensayo a través del rango de concentración y las señales en presencia de APRIL murina fueron comparables con las de los pocillos controles en donde no se había añadido APRIL murina. En los casos de competencia, se midió una disminución de la señal dependiente de la concentración (ver Ejemplo 5a).

20      Figura 6. Competencia por la unión mediante FACS en las células H929. La competencia del Δ-APRIL murina con los anticuerpos anti-BCMA se detectó por citometría de flujo. Intensidad media de fluorescencia relativa de Δ-APRIL (señal de FITC) usada a una concentración de 1.000 ng/mL detectada en función de la concentración (1 y 16 µg/mL) de los anticuerpos anti-BCMA de los clones 83A10, 17A5, y 13A4 en las células H929. La intensidad media de fluorescencia tras la unión con Δ-APRIL presencia del control de isotipo fue establecido como uno; las otras señales se normalizaron con ese valor. La detección de la unión de APRIL a las células H929 BCMA-positivas en presencia de los anticuerpos anti-BCMA se midió via un anticuerpo anti-HA conjugado con fluorocromo (ver Ejemplo 5b).

30      Figura 7. Competencia por la unión mediante FACS en las células RPMI-8226. La competencia de los anticuerpos anti-BCMA con Δ-APRIL se detectó por citometría de flujo. Intensidad media de fluorescencia relativa del anticuerpo anti-BCMA (señal de Alexa.Fluor 647) usado a una concentración de 40 µg/mL para el anticuerpo anti-BCMA de los clones 13A4, 17A5, 83A10 en las células RPMI-8226 detectada en ausencia o en presencia de Δ-APRIL 1.000 ng/mL. La intensidad media de fluorescencia tras la unión con los anticuerpos anti-BCMA en ausencia de Δ-APRIL fue establecido como uno; las otras señales respectivas al anticuerpo anti-BCMA en presencia de Δ-APRIL se normalizaron con ese valor. La detección de la unión de los anticuerpos anti-BCMA a las células RPMO-8226 BCMA-positivas en presencia de Δ-APRIL se midió vía un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con fluorocromo (ver Ejemplo 5c).

35      Figura 8. Competencia de los anticuerpos anti-BCMA con Δ-APRIL en las células H929 luego de la incubación simultánea detectada por citometría de flujo. (A) Se midieron la intensidad media de fluorescencia y la señal de fluorescencia relativa (señal de Alexa.Fluor 647) del anticuerpo anti-BCMA de los clones 13A4, 17A5, 83A10 a la concentración de 20 µg/mL en presencia o ausencia de 2,5 µg/mL de Δ-APRIL o (B) la intensidad media de fluorescencia y la señal de fluorescencia relativa de Δ-APRIL (señal de FITC) a una concentración de 2,5 µg/mL de Δ-APRIL y el anticuerpo anti-BCMA del clon 83A10 (20 µg/mL) (señal de Alexa.Fluor 647). La detección del anticuerpo anti-BCMA en presencia de Δ-APRIL con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con FITC fue normalizada con la señal del clon productor del anticuerpo anti-BCMA en ausencia de Δ-APRIL. La detección de Δ-APRIL en presencia del clon productor del anticuerpo anti-BCMA con el anticuerpo anti-HA conjugado con Alexa.Fluor 647 fue normalizada con la señal de Δ-APRIL en presencia del control de isotipo (ver Ejemplo 5d).

45      Figura 9. Efecto de los anticuerpos anti-BCMA tras la unión a las células H929 sobre la activación de NF-κB en ausencia de APRIL detectado por un ensayo de quimioluminiscencia basado en ELISA. La detección de la activación de NF-κB tras la unión de los anticuerpos anti-BCMA (17A5, 83A10) y de los anticuerpos control de isotipo a las

células H929 que expresan BCMA se midió usando un ensayo de quimioluminiscencia basado en ELISA (ver Ejemplo 6).

5 Figura 10. Producción y purificación del anticuerpo 83A10-TCB sin la variante de carga vs. El anticuerpo 83A10-TCBcv con la variante de carga. Los gráficos de CE-SDS (no-reducidos) de las soluciones proteicas finales luego de los respectivos métodos de purificación de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. Pasos de purificación por cromatografía de afinidad en proteína A (PA) y cromatografía de exclusión molecular (SEC) aplicados al anticuerpo 83A10-TCB (A). (B) Pasos de purificación adicionales: cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y cromatografía de exclusión molecular final (re-SEC) aplicados a las preparaciones proteicas finales (A). (C) Anticuerpo 83A10-TCBcv después de los pasos de purificación por PA + cIEX + SEC. Las moléculas 83A10-TCB and 83A10-TCBcv están ambas en el formato molecular, tal como se describe en la Figura 2a (ver Ejemplo 8).

15 Figura 11. Estudio de comparación cabeza-a-cabeza: Producción del 83A10-TCB sin carga vs. 83A10-TCBcv con la variante de carga. Las propiedades (por ej., pureza, rendimiento, contenido de monómeros) de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se midieron juntas y se compararon después de cada etapa de purificación 1) solo cromatografía de afinidad en PA (A, B), 2) cromatografía de afinidad en PA, seguido de SEC (C, D) y 3) cromatografía de afinidad en PA, seguido de SEC, seguido de cIEX y re-SEC (E, F). Los gráficos de CE-SDS (no-reducidos) de las soluciones proteicas finales luego de los respectivos métodos de purificación de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. (A) Paso de purificación por cromatografía de afinidad en PA aplicado al anticuerpo 83A10-TCB. (B) Paso de purificación por cromatografía de afinidad en PA aplicado al anticuerpo 83A10-TCBcv. (C) Pasos de purificación por cromatografía de afinidad en PA + SEC aplicados al anticuerpo 83A10-TCB. (D) Pasos de purificación por cromatografía de afinidad en PA + SEC aplicado al anticuerpo 83A10-TCBcv. (E) Pasos de purificación por cromatografía de afinidad en PA +/- SEC + cIEX + SEC aplicados al anticuerpo 83A10-TCB. (F) Pasos de purificación por cromatografía de afinidad en PA +/- SEC + cIEX + SEC aplicados al anticuerpo 83A10-TCBcv. Se midieron la pureza, el rendimiento y el contenido de monómeros. Porcentaje de moléculas correctas detectado por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) (ver Ejemplo 8).

25 Figura 12. Unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células HEK que expresan al BCMA murino (A) y a las células HEK que expresan al BCMA del mono cynomolgus (B) detectada por citometría de flujo (ver Ejemplo 10).

30 Figura 13. Unión de los anticuerpos TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 a las células H929 BCMA-positivas medida por citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 se graficó en función de la concentración del anticuerpo; (A) 83A10-TCBcv en las células H929 y en las células MKN45; (B) 17A5-TCBcv en las células H929 y en las células MKN45 (ver Ejemplo 11).

35 Figura 14. Unión de los anticuerpos TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 a las células Jurkat CD3-positivas medida por citometría de flujo. Intensidad media de fluorescencia de los anticuerpos anti-BCMA/anti-CD3 (83A10-TCBcv (A); 17A5-TCBcv (B)) al unirse a las células Jurkat y graficada en función de la concentración del anticuerpo. No se produjo unión a las células MKN45 que son BCMA-negativas y CD3-negativas (ver Ejemplo 12).

40 Figura 15. Efecto de los anticuerpos TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por APRIL detectado por citometría de flujo. (A) Efecto del anticuerpo 83A10-TCBcv que no compite con APRIL en comparación con el anticuerpo J6M0-TCB que compite con APRIL (1.000 ng/mL) sobre la activación de NF- $\kappa$ B en las células H929. (B) Efecto del anticuerpo 83A10-TCB que no compite con APRIL en comparación con el anticuerpo J6M0-TCB que compite con APRIL (concentraciones saturadas de 5.000 ng/mL) sobre la activación de NF- $\kappa$ B en las células H929. Detección de NF- $\kappa$ B fosforilado intracelular por citometría de flujo (ver Ejemplo 13).

45 Figura 16. Efecto de los anticuerpos TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 en la activación de NF- $\kappa$ B en las células H929 en ausencia de APRIL detectado por citometría de flujo. (A) Efecto del anticuerpo 83A10-TCBcv que no compite con APRIL sobre la activación de NF- $\kappa$ B en las células H929 en ausencia de APRIL (experimento 1). (B) Efecto del anticuerpo 83A10-TCB que no compite con APRIL sobre la activación de NF- $\kappa$ B en las células H929 en ausencia de APRIL (experimento 2). Detección de NF- $\kappa$ B fosforilado intracelular por citometría de flujo (ver Ejemplo 14).

Figura 17. Activación de células T mediada por los anticuerpos TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 en presencia de las células H929 detectada por citometría de flujo. Nivel de expresión del marcador de activación temprana CD69 (C, D), y del marcador de activación tardía CD25 (A, B) en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> luego de 48 h de incubación. El anticuerpo 83A10-TCBcv indujo un aumento en la regulación de los marcadores de activación CD69 y CD25 en una manera específica y dependiente de la concentración en presencia de las células blanco BCMA-positivas. La relación E:T usada fue 10 PBMC : 1 célula H929; las células se incubaron por 48h antes de la medición del aumento en la regulación de CD69 y CD25. Se muestran los resultados representativos obtenidos a partir de dos experimentos independientes (ver Ejemplo 15).

Figura 18. Los anticuerpos TCBcv anti-BCMA/anti-CD3 inducen la muerte redirigida por parte de las células T a las células de mieloma H929 BCMA-positivas, detectado por el ensayo colorimétrico de liberación de la LDH. Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 ((A) 83A10-TCBcv, (B) 17A5-TCBcv) indujeron la muerte de las células de mieloma H929 BCMA-positivas de una manera dependiente de la concentración, tal como se midió en el ensayo de liberación de la LDH. La relación E:T ratio usada fue de 10 PBMC:1 célula H929; las células se incubaron 24h antes de la medición de la liberación de la LDH (ver Ejemplo 18).

Figura 18-1. Lisis redirigida por parte de las células T a las células de MM H929 inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por la liberación de la LDH. Curva dosis-respuesta de la lisis de las células de MM H929 inducida por el 83A10-TCBcv (círculo abierto, línea de puntos). Se observó que la muerte celular de las células H929 fue dependiente de la concentración del anticuerpo 83A10-TCB mientras que no se observó muerte con el control-TCB. Los experimentos se llevaron a cabo con el donante 1 de PBMC (A), el donante 3 (B), el donante 4 (C), el donante 5 (D), usando una relación E:T de 10 PBMC : 1 célula de MM (ver Ejemplo 18).

Figura 18-2. Lisis redirigida por parte de las células T a las células de MM L363 inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por la liberación de la LDH. Curva dosis-respuesta de la lisis de las células de MM L363 inducida por el 83A10-TCBcv (círculo abierto, línea de puntos). Se observó que la muerte celular de las células L363 fue dependiente de la concentración del anticuerpo 83A10-TCB mientras que no se observó muerte con el control-TCB. Los experimentos se llevaron a cabo con el donante 1 de PBMC (A), el donante 2 (B), el donante 3 (C), el donante 4 (D), el donante 5 (E) usando una relación E:T de 10 PBMC : 1 célula de MM (ver Ejemplo 19).

Figura 18-3. Lisis redirigida por parte de las células T a las células de MM RPMI-8226 inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por la liberación de la LDH. Curva dosis-respuesta de la lisis de las células de MM RPMI-8226 inducida por el 83A10-TCBcv (círculo abierto, línea de puntos). Se observó que la muerte celular de las células RPMI-8226 fue dependiente de la concentración del anticuerpo 83A10-TCB mientras que no se observó muerte con el control-TCB. Los experimentos se llevaron a cabo con el donante 2 de PBMC (A), el donante 3 (B), el donante 4 (C), el donante 5 (D) usando una relación E:T de 10 PBMC : 1 célula de MM (ver Ejemplo 19A).

Figura 18-4. Lisis redirigida por parte de las células T a las células de MM JJN-3 inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo. Muerte de las células de MM JJN-3 dependiente de la concentración de 83A10-TCBcv (círculos abiertos, línea de puntos). Se determinó y graficó el porcentaje de células JJN-3 anexina-V-positivas (A, C) y lisis de las células tumorales (B, D). Porcentaje de lisis de las células JJN-3 inducida por una concentración específica del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 determinado de la siguiente manera: el recuento absoluto de las células JJN-3 anexina-V-negativas a una determinada concentración del TCB y restando dicho valor del recuento absoluto de las células JJN-3 anexina-V-negativas en ausencia del TCB; dividido por el recuento absoluto de las células JJN-3 anexina-V-negativas en ausencia del TCB. Los experimentos se llevaron a cabo con 2 donantes de PBMC: donante 1 (A, B) y donante 2 (C, D) usando una relación E:T de 10 PBMC : 1 célula de MM (ver Ejemplo 19B).

Figura 19. Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 inducen la muerte redirigida por parte de las células T a las células de mieloma H929 BCMA-positivas en presencia de APRIL, detectada mediante el ensayo de liberación de la LDH. (A) Anticuerpo 83A10-TCBcv que no bloquea/no compite con APRIL en ausencia de APRIL exógena y en presencia de 100 ng/mL o 1.000 ng/mL de APRIL exógena. (B) Anticuerpo J6M0-TCB que bloquea/compite con APRIL en ausencia de APRIL exógena y en presencia de 100 ng/mL o 1.000 ng/mL de APRIL exógena. La relación

E:T usada fue 10 PBMC:1 célula H929; las células se incubaron 24h antes de la medición de la liberación de la LDH (ver Ejemplo 20).

5 Figura 20. Comparación de las propiedades biológicas de la variante sin carga del 83A10-TCB con respecto a la variante con carga del 83A10-TCBcv. (A) Comparación cabeza-a-cabeza: unión de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv a las células H929 detectado por citometría de flujo (experimento 1); (B) Comparación cabeza-a-cabeza: unión de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv a las células H929 y a las células MKN45 detectado por citometría de flujo (experimento 2); (C-F) Comparación del anticuerpo 83A10-TCB (C, D) y el anticuerpo 83A10-TCBcv (E, F) para inducir la muerte redirigida por parte de las células T a las células de mieloma H929 BCMA-positivas. La relación E:T usada fue 10 PBMC : 1 célula H929; las células se incubaron 24h antes de la medición de la liberación de la LDH (ver Ejemplo 21).  
10

15 Figura 21. Lisis redirigida por parte de las células T a las células plasmáticas de médula ósea de un paciente con mieloma múltiple en presencia de células T infiltradas autólogas (aspirados de médula ósea entera de pacientes) inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo multiparametral. Se determinó el porcentaje de células plasmáticas de mieloma anexina-V-positivas y se graficó en función de la concentración de TCB. Se observó la lisis de las células plasmáticas de mieloma de pacientes de manera específica y dependiente de la concentración de 83A10-TCBcv mientras que no se observó la lisis de las células T, células B, y células NK, en base a un panel multiparametral de 8 colores. No hubo inducción de la muerte celular de las células plasmáticas de mieloma con el control-TCB a la mayor concentración ensayada de los anticuerpos TCB (ver Ejemplo 23).

20 Figura 22. Lisis redirigida por parte de las células T a las células plasmáticas de médula ósea de un paciente con mieloma múltiple en presencia de células T infiltradas autólogas inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo. El porcentaje de células plasmáticas de mieloma viables se determinó mediante la selección de la población anexina-V-negativa y se graficó en función de la concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv para el Paciente 001 (A), Paciente 002 (B) y Paciente 003 (c). El 83A10-TCBcv indujo la lisis de las células plasmáticas de mieloma en las muestras de aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma. Se observó una disminución dependiente de la concentración de las células de mieloma viables en 3/3 muestras de pacientes tratados con 83A10-TCBcv. Comparación de 83A10-TCBcv con J6M0-TCBcv (un anticuerpo que se documentó que compite con APRIL por la unión al BCMA (Tai et al., Blood 2014)): En 3/3 muestras de pacientes, el 83A10-TCBcv indujo una mayor lisis de las células plasmáticas de mieloma de la médula ósea de los aspirados de pacientes que el J6M0-TCB a la dosis equimolar máxima de 30 nM (ver Ejemplo 23).  
25  
30

35 Figure 23. Lisis redirigida por parte de las células T a las células plasmáticas de médula ósea de un paciente con mieloma múltiple en presencia de células T infiltradas autólogas inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 medida por citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células plasmáticas de mieloma yoduro de propidio-negativas y el porcentaje de células plasmática de médula ósea viables relativo al control del medio (MC) se graficó en función de las concentraciones de TCB. Se observó la lisis de las células plasmáticas de un paciente con mieloma de manera específica y dependiente de la concentración de 83A10-TCBcv (A – G) mientras que no se observó la lisis del microambiente de la médula ósea (BMME) (H). No se observó la inducción de la muerte celular en las células plasmáticas de mieloma tratadas con el control-TCB a la mayor concentración ensayada de los anticuerpos TCB. El 83A10-TCBcv indujo la muerte potente de las células plasmáticas de mieloma de la médula ósea de un paciente, tal como se refleja por la disminución dependiente de la concentración de las células plasmáticas de mieloma viables (yoduro de propidio-negativas). Un efecto fue considerado estadísticamente significativo si el P-valor del correspondiente test estadístico fue <5% (\*), < 1% (\*\*) o <0.1% (\*\*\*). Los experimentos se realizaron usando muestras de aspirados de médula ósea del paciente 1 (A), paciente 2 (B), paciente 3 (C), paciente 4 (D), paciente 5 (E), paciente 6 (F), y paciente 7 (G, H) (ver Ejemplo 23).  
40  
45

Figura 24. Activación de las células T de médula ósea de un paciente con mieloma en presencia de células plasmáticas de médula ósea (aspirados de médula ósea entera del paciente) inducida por el anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv medida por citometría de flujo multiparametral (panel de tinción con 8 colores). Activación de las células T CD4 (arriba) y activación de las células T CD8 (abajo) (ver Ejemplo 23A).



Figura 25. Concentraciones de 83A10-TCBcv medidas a partir de las muestras séricas después de la administración de una dosis única por vía IV con 0,0082, 0,082 y 0,82 mg/kg de 83A10-TCBcv en los ratones inmunodeficientes NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG). La recolección de las muestras séricas se realizó a pre-dosis y a las 0,25; 0,5; 1; 3; 7; 24; 48; 96; 168; 240 h después de la dosificación (ver Ejemplo 24).

5 Figura 26. Concentraciones de 83A10-TCBcv medidas a partir de las muestras séricas (símbolos cerrados con líneas completas) y las muestras de médula ósea (símbolos abiertos con línea de puntos) después de la administración de una dosis única por vía IV con 0,003, 0,03 y 0,1 mg/kg de 83A10-TCBcv a los monos cynomolgus. La recolección de las muestras séricas se realizó a pre-dosis y a los 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de la dosificación. Las muestras de médula ósea se recolectaron a pre-dosis, y a las 96 y 336 h después de la dosificación (ver Ejemplo 24A).  
10

Figura 27. Redistribución de células T periféricas observada en los monos cynomolgus luego de una dosis única de 83A10-TCBcv (0,003, 0,03 y 0,3 mg/kg). Los animales A y B, C y D, y E y F recibieron respectivamente una inyección IV de 0,003, 0,03 y 0,3 mg/kg de 83A10-TCBcv. Se graficaron los recuentos absolutos de las células T sanguíneas (células CD2+ por  $\mu\text{L}$  de sangre) en función del tiempo post-tratamiento (ver Ejemplo 24A).

15 Figura 28. Disminución de las células plasmáticas sanguíneas observada en monos cynomolgus luego de una dosis única de 83A10-TCBcv (0,3 mg/kg) medida mediante citometría de flujo multiparametral. Las células plasmáticas (PC) se identificaron en base a un panel de tinción con 6 colores y los porcentajes de PC sobre los linfocitos se midieron y graficaron en gráficos de contorno (A). En (B) se grafica la cinética de depleción de las células plasmáticas sanguíneas después del tratamiento con 83A10-TCBcv 0,3 mg/kg en monos cynomolgus (ver Ejemplo 24A).  
20

Figura 29. Actividad antitumoral inducida por el anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv en el modelo de injerto de mieloma humano con H929 en ratones NOG humanizados con PBMC. Los ratones inmunodeficientes NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) recibieron el día 0 (d0) por vía subcutánea (SC) células de mieloma múltiple H929 en el flanco dorsal derecho. El día 15 (d15), los ratones NOG recibieron una única inyección intraperitoneal (IP) de PBMC humanas. Los ratones fueron cuidadosamente aleatorizados en los distintos grupos de tratamiento y control (n=9/grupo) y se llevó a cabo un análisis estadístico para evaluar la homogeneidad entre los grupos. Los grupos experimentales fueron el grupo control sin tratamiento, el grupo control tratado con TCB, el grupo tratado con 2,6 nM/kg de 83A10-TCBcv 2,6 nM/kg y el grupo tratado con 2,6 nM/kg de BCMA50-BiTE® (BCMAxCD3 (scFv)<sub>2</sub>). El tratamiento con anticuerpos administrados por la vena de la cola empezó el día 19 (d19), es decir, 19 días después de la inoculación SC de las células tumorales H929. El esquema de tratamiento con el anticuerpo TCB consistió en la administración del anticuerpo una vez por semana por vía IV durante 3 semanas (es decir, 3 inyecciones en total del anticuerpo TCB). El volumen del tumor (TV) se midió con un calibrador durante el estudio y el progreso se evaluó mediante la comparación intergrupar del TV. El TV ( $\text{mm}^3$ ) se graficó en función de los días posteriores a la inyección del tumor. El día 19 (d19), primer día de tratamiento, el volumen promedio del tumor fue de  $300 \pm 161 \text{ mm}^3$  para el grupo control tratado con el vehículo (A),  $315 \pm 148 \text{ mm}^3$  para el grupo control tratado con 2,6 nM/kg de TCB (A),  $293 \pm 135 \text{ mm}^3$  para el grupo tratado con 2,6 nM/kg de 83A10-TCBcv (B) y  $307 \pm 138 \text{ mm}^3$  para el grupo tratado con 2,6 nM/kg de (BCMA50-BiTE®) (C). El TV de cada ratón individual por grupo experimental se graficó en función de los días posteriores a la inyección del tumor: (A) grupos control que incluyen al control del vehículo (línea entera) y al control-TCB (línea de puntos), (B) grupo tratado con 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg), y (C) grupo tratado con BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg). Las flechas negras muestran al tratamiento con TCB administrado por vía IV. En el grupo tratado con 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg), 6 de 9 ratones (67%) habían retrocedido su tumor aun por debajo del TV documentado el d19 es decir, el primer tratamiento con TCB y la regresión del tumor se mantuvieron hasta la finalización del estudio. Los 3 ratones del grupo tratado con 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg) que fracasaron en demostrar la regresión del tumor, tenían su TV igual al d19, 376, 402 y 522  $\text{mm}^3$  respectivamente. En contraste, ninguno de los 9 ratones (0%) tratados con una dosis equimolar de BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg) en un esquema semanal de una sola vez por semana durante 3 semanas tuvieron su tumor en regresión en ningún punto del tiempo (ver Ejemplo 25).  
25  
30  
35  
40  
45

Figura 30. Porcentaje del crecimiento del tumor (TG) calculado para d19 a d43 y comparado entre el grupo con el anticuerpo 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg) y el BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg). El porcentaje del crecimiento del tumor definido como TG (%) se determinó mediante el cálculo  $\text{TG} (\%) = 100 \times (\text{mediana del TV del grupo analizado}) / (\text{mediana del TV del grupo control tratado con el vehículo})$ . Por razones éticas, los ratones fueron sacrificados cuando el TV alcanzó al menos  $2.000 \text{ mm}^3$ . El TG (%) estaba consistentemente y significativamente disminuido en el  
50

grupo 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg) así como el TG (%) fue siempre menor cuando se lo comparó con BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg) (ver Ejemplo 25).

### **Descripción Detallada de la Invención**

- 5 Los inventores han encontrado que los anticuerpos biespecíficos contra CD3ε BCMA con un intercambio VH/VL pueden producirse con altos rendimientos y pueden ser fácilmente purificados si en el CL de la cadena liviana de la porción del anticuerpo contra CD3ε o BCMA el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en el respectivo dominio constante el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 es sustituido independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).
- 10 Preferentemente el intercambio VH/VL es en la porción que se une al CD3. Preferentemente, el anticuerpo biespecífico es monovalente para la unión al CD3. Las sustituciones aminoacídicas descritas arriba pueden ser en la porción que se une al BCMA o en la porción que se une al CD3. Por consiguiente, en una cierta realización de la invención la porción que se une al CD3 puede comprender al intercambio VH/VL y a las sustituciones aminoacídicas 124, 147, 213, o 123. Preferentemente, el anticuerpo biespecífico es monovalente para la unión al CD3 y bivalente
- 15 para la unión al BCMA. Como fue descrito, el anticuerpo biespecífico puede por consiguiente comprender a una segunda porción que se une al BCMA, la cual es idéntica a la primera. Por lo tanto, si la primera porción que se une al BCMA comprende a las sustituciones aminoacídicas, la segunda porción que se une al BCMA comprende a las mismas sustituciones y si la primera porción que se une al BCMA no comprende a las sustituciones aminoacídicas, la segunda porción que se une al BCMA no comprende a las sustituciones. Preferentemente, el aminoácido 124 es
- 20 K, el aminoácido 147 es E, el aminoácido 213 es E, y el aminoácido 123 es R. Preferentemente, la porción que se une al CD3 y la porción que se une al BCMA (a ambas porciones que se unen al BCMA si es así) son fragmentos Fab, por donde cuando están presentan dos porciones que se unen al BCMA, una porción del BCMA está unida químicamente a la porción que se une al CD3 vía CH1/VL (el C-terminal de la porción que se une al BCMA (CH1) al N-terminal de la porción de entrecruzamiento que se une al CD3 (VL)) o CH1/VH (el C-terminal de la porción de entrecruzamiento que se une al CD3 (CH1) al N-terminal de la porción que se une al BCMA (VH)). El anticuerpo
- 25 biespecífico puede comprender o no comprender a una porción Fc.

El término “blanco” tal como aquí se utiliza, significa BCMA o CD3. El término “primer blanco y segundo blanco” significa CD3 como primer blanco y BCMA como segundo blanco o significa BCMA como primer blanco y CD3 como segundo blanco.

- 30 El término “BCMA” tal como se lo utiliza aquí se refiere al antígeno de maduración de las células B humanas, también conocido como BCMA; TR17\_HUMAN, TNFRSF17 (UniProt Q02223), el cual es un miembro de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral, que se encuentra preferentemente expresado en las células plasmáticas diferenciadas. El dominio extracelular del BCMA consiste de acuerdo con UniProt en los aminoácidos 1 – 54 (o 5-51). El término “anticuerpo contra BCMA, anticuerpo anti-BCMA” tal como se lo utiliza aquí se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al BCMA.
- 35

- El término “CD3ε o CD3” tal como se lo utiliza aquí se refiere al CD3ε humano descrito como UniProt P07766 (CD3E\_HUMAN). El término “anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti-CD3” se refiere a un anticuerpo que se une al CD3ε. Preferentemente, el anticuerpo comprende a un dominio variable VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas y un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas livianas. Preferentemente, el anticuerpo comprende a los dominios variables de SEQ ID NO:7 (VH) y SEQ ID NO:8 (VL). El término “anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti-CD3” tal como se lo utiliza aquí se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al CD3.
- 40

- 45 “Que se une específicamente al CD3 o al BCMA” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse al CD3 o al BCMA (los blancos) con la afinidad suficiente como para que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico al elegir como blancos al CD3 o al BCMA. En algunas realizaciones, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD3 o anti-BCMA a una proteína no relacionada no CD3 o no BCMA es aproximadamente 10 veces preferentemente >100 veces menor que la unión del anticuerpo al CD3 o al BCMA, según lo medido, por ej., mediante resonancia

plasmática de superficie (SPR), por ej. Biacore®, enzima inmunoensayo (ELISA) o citometría de flujo (FACS). Preferentemente el anticuerpo que se une al CD3 o al BCMA tiene una constante de disociación (Kd) de  $10^{-8}$  M o menor, preferentemente de  $10^{-8}$  M a  $10^{-13}$  M, preferentemente de  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  M. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD3 y/o anti-BCMA se une a un epítipo del CD3 y/o del BCMA que se encuentra conservado entre los CD3 y/o BCMA de las distintas especies, preferentemente entre humanos y cynomolgus. “Anticuerpo biespecífico que se une específicamente al CD3 y al BCMA” o “anticuerpo de acuerdo con la invención” o “anticuerpo biespecífico contra CD3 y BCMA” se refiere a una respectiva definición para la unión a ambos blancos. Un anticuerpo que se une específicamente al BCMA (o BCMA y CD3) no se une a otros antígenos humanos. Por consiguiente, en un ELISA, los valores de DO de tales blancos no relacionados van a ser iguales o menores que a los del límite de detección del ensayo específico, preferentemente  $> 0,3$  ng/mL, o igual o menor a los valores de DO de las muestras control sin BCMA unido a la placa o con células HEK293 no transfectadas.

El término “anticuerpo BCMA variante” tal como se los utiliza aquí se refiere a un anticuerpo anti-BCMA, que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4 con un sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas en las respectivas posiciones 95 (N95) o 96 (G96) dentro de la CDR3H de SEQ ID NO:29 ya sea mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 95, ya sea N95S, N95T, N95E, N95Q, N95A, o N95G, o mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 96, ya sea G96E, o G96Q. También se refiere a un anticuerpo de la invención, que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4 con una sustitución aminoacídica seleccionada entre grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas en las respectivas posiciones 27 (N27f) y 28 (G28) dentro de la CDR1L de SEQ ID NO:32 ya sea mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 27, ya sea N27fS, N27fT, N27fE, N27fQ, N27fA, o N27fG o mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 28, ya sea, G28E, o G28Q. También se refiere a un anticuerpo de la invención, que comprende al anticuerpo 13A4 con una sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas en las respectivas posiciones 54 (D54) y 55 (S55) dentro de la CDR2H de SEQ ID NO:26 ya sea mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 54, ya sea D54S, D54T, D54E, D54Q, D54A, o D54G o mediante un solo cambio aminoacídico en la posición 55, ya sea S55A, S55E, o S55Q. También se refiere a un anticuerpo de la invención, que comprende a las secuencias del anticuerpo 13A4 con una sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas W en la posición 33 (W33) dentro de la CDR1H de SEQ ID NO:23 ya sea W33F, W33Y, W33V, W33I, W33L, o W33A.

El término “anticuerpo BCMA variante” tal como se lo utiliza aquí se refiere a un anticuerpo de la invención, que comprende a las secuencias del anticuerpo 83A10, con una sustitución aminoacídica seleccionada entre el grupo constituido por las sustituciones aminoacídicas en la posición 98 (W98) dentro de la CDR3H de SEQ ID NO:27 ya sea W98F, W98Y, W98V, W98I, W98L, o W98A.

El término “APRIL” tal como se lo utiliza aquí se refiere a una APRIL recombinante murina truncada ( $\Delta$ -APRIL) (aminoácidos 106–241; NP\_076006). APRIL se puede producir según lo descrito en Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009–18) y también se encuentra comercialmente disponible (R&D Systems Europa).

Los anticuerpos anti-BCMA se analizaron mediante ELISA por la unión al BCMA humano usando placas sensibilizadas con BCMA en presencia y ausencia de APRIL. Para este ensayo, se usó una determinada cantidad de BCMA unido a la placa, preferentemente  $1,5\mu\text{g/mL}$  y una determinada concentración de anticuerpos anti-BCMA, preferentemente dentro del rango de  $1\text{ pM}$  a  $200\text{ nM}$ . Un anticuerpo BCMA para el cual su unión al BCMA no es inhibida de acuerdo con la invención, es un anticuerpo anti-BCMA “que no inhibe la unión de APRIL al BCMA humano en un ensayo de ELISA”.

El término “NF- $\kappa$ B” tal como se lo utiliza aquí se refiere al NF- $\kappa$ B p50 recombinante (número de acceso (P19838)).

La actividad de NF- $\kappa$ B se midió por un ELISA que une ADN de un extracto de células de MM NCI-H929 (CRL-9068™). Las células de MM NCI-H929, no tratadas o tratadas con  $0,1\text{ pM}$  a  $200\text{ nM}$  del control de isotipo o con  $0,1\text{ pM}$  a  $200\text{ nM}$  de anticuerpos anti-BCMA e incubadas durante 20 min en ausencia de APRIL. La actividad de NF- $\kappa$ B se ensayó usando un ELISA funcional que detecta una señal quimioluminiscente proveniente del p65 unida a la secuencia consenso de NF- $\kappa$ B (US6150090).

5 Preferentemente, la actividad de NF-κB es medida por citometría de flujo al medir al NF-κB p65 fosforilado intracelular (pS529) en las células de MM NCI-H929 (CRL-9068™). Las células de MM NCI-H929, no tratadas o tratadas con 1.000 ng/mL, preferentemente 3.000 ng/mL, preferentemente 5.000ng/mL de APRIL por 1 min a 30 min, preferentemente 15 min, y previamente incubadas con 0,1 pM a 200 nM de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 o los anticuerpos control de isotipo por 20 min sin APRIL o concomitantemente con APRIL. La actividad de NF-κB se ensayó usando un ensayo de citometría de flujo que detecta la señal intracelular de las S529 fosforilada del p65 unido a la secuencia consenso de NF-κB (US6150090).

10 Si también un anticuerpo de acuerdo con la invención se usa en exceso, preferentemente hasta 500 nM o 1.000 nM, la unión de dicho anticuerpo al BCMA no disminuye con 140 ng/ml de APRIL en más de un 10%, preferentemente en no más de un 6%, preferentemente en no más de un 1%.

Preferentemente, si un anticuerpo de acuerdo con la invención se usa en exceso, preferentemente hasta 107 nM, la unión de 1.000 ng/ml de APRIL a las células NCI-H929 (CRL-9068™) no disminuye en más de un 10%, preferentemente en no más de un 5%, preferentemente en no más de un 1 % en presencia de dicho anticuerpo.

15 Preferentemente, si un anticuerpo de acuerdo con la invención se usa en exceso, preferentemente hasta 267 nM, la unión de dicho anticuerpo a las células RPMI8226 (CCL-155™) no disminuye en presencia de 1.000 ng/ml de APRIL en más de un 10%, preferentemente en no más de un 5%, preferentemente en no más de un 1%.

En una realización preferida, si un anticuerpo de acuerdo con la invención se usa en exceso, preferentemente hasta 133 nM, la unión de dicho anticuerpo a las células NCI-H929 (CRL-9068™) no disminuye en presencia de 2.500 ng/ml de APRIL en más de un 25%, preferentemente en no más de un 20%, preferentemente en no más de un 10%.

20 Preferentemente, si un anticuerpo de acuerdo con la invención se usa en exceso, preferentemente hasta 400 nM, dicho anticuerpo no altera la activación de NF-κB inducida por APRIL en las células NCI-H929 (CRL-9068™) en más de un 30% en presencia de 1.000 ng/mL, preferentemente 3.000 ng/mL, preferentemente 5.000 ng/mL de APRIL.

25 En una realización preferida, si un anticuerpo de acuerdo con la invención se usa en exceso, preferentemente hasta 400 nM, dicho anticuerpo no induce la activación de NF-κB en las células NCI-H929 (CRL-9068™) en más del 5% en ausencia de APRIL.

Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado porque presenta un valor de EC50 por unirse a las células NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™) de 30 nM o menor, preferentemente un valor de EC50 de 15 nM y menor.

30 Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con esta invención es caracterizado por su capacidad de unirse a las células RPMI8226 (CCL-155™).

En una realización preferida, un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado por su capacidad de unirse a las células T humanas. El término "TCB" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al BCMA o al CD3.

35 Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con esta invención es caracterizado por su capacidad de unirse al BCMA del mono cynomolgus expresado transitoriamente sobre las células HEK.

En una realización preferida, un anticuerpo de acuerdo con esta invención es caracterizado por su capacidad de inducir la activación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia de las células tumorales que expresan BCMA.

Preferentemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es caracterizado por su capacidad de inducir la muerte redirigida a las células tumorales NCI-H929 en presencia de las células T humanas con un EC50 menor a 0,1 nM, preferentemente 0,05 nM, preferentemente 0,02 nM, preferentemente 0,002 nM y menor.

5 Preferentemente, la potencia (por ej., EC50) para inducir la muerte redirigida por parte de las células T a las células NCI-H929 de un anticuerpo de acuerdo con la invención se define por no ser reducida o ser mínimamente reducida por las concentraciones clínicamente relevantes de APRIL; caracterizada porque la adición de 100 ng/ml de APRIL modifica el EC50 para inducir la muerte de las células NCI-H929 por menos de un factor de 4, preferentemente por menos de un factor de 2, preferentemente por menos de un factor de 1,5; más preferentemente la adición de 1.000 ng/mL de APRIL modifica el EC50 para inducir la muerte de las células NCI-H929 por menos de un factor de 6,5,  
10 preferentemente por menos de un factor de 5, preferentemente por menos de un factor de 4, preferentemente por menos de un factor de 3, preferentemente por menos de un factor de 2, preferentemente por menos de un factor de 1,5.

15 El término "anticuerpo" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo consiste en dos pares de una "cadena liviana" (LC) y de una "cadena pesada" (HC) (tales pares de cadenas livianas (LC) / cadenas pesadas (HC) se abrevian aquí como LC/HC). Las cadenas livianas y pesadas de tales anticuerpos son polipéptidos que consisten en varios dominios. Cada cadena pesada comprende a una región variable de la cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y a una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende a los dominios constantes de la cadena pesada CH1, CH2 y CH3 (anticuerpos de las clases IgA, IgD, e IgG) y opcionalmente el dominio constante de la cadena pesada CH4 (anticuerpos de las clases IgE e IgM).  
20 Cada cadena liviana comprende a un dominio variable de la cadena liviana VL y un dominio constante de la cadena liviana CL. Los dominios variables VH y VL pueden ser adicionalmente subdivididos en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones framework (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FRs, ordenados del amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.  
25 Los "dominios constantes" de la cadena pesada y de la cadena liviana no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo a un antígeno blanco, pero exhibe varias funciones efectoras.

30 La "cadena liviana de un anticuerpo" tal como se utiliza aquí es un polipéptido que comprende en la dirección del N-terminal al C-terminal un dominio variable de la cadena liviana (VL), y un dominio constante de la cadena liviana (CL), abreviados como VL-CL. Un "entrecruzamiento de cadena liviana (VH-CL)" tal como se utiliza aquí es una cadena liviana en donde el dominio VL es reemplazado por el respectivo dominio VH. La "cadena pesada de un anticuerpo" tal como se utiliza aquí es un polipéptido que comprende en la dirección N-terminal al C-terminal un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio constante 1 de la cadena pesada (CH1). Un "entrecruzamiento de cadena pesada (VL-CH1)" tal como se utiliza aquí es una cadena pesada en donde el dominio VH es reemplazado por el respectivo dominio VL.

35 Existen varias aproximaciones para las modificaciones del CH3 para favorecer la heterodimerización, que están ampliamente descritos en por ej., WO96/27011, WO98/050431, EP1870459, WO2007/110205, WO2007/147901, WO2009/089004, WO2010/129304, WO2011/90754, WO2011/143545, WO2012058768, WO2013157954, WO2013096291. Típicamente en todas estas aproximaciones, el primer dominio CH3 y el segundo dominio CH3 se manipulan ambos de una manera complementaria para que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo contiene)  
40 no pueda auto-homodimerizarse más pero se fuerza para que se heterodimerice con el dominio CH3 obtenido por ingeniería complementario (de manera tal que el primer y segundo dominio CH3 se heterodimericen y no se formen homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3) Estas aproximaciones para mejorar la heterodimerización de las cadenas pesadas están contempladas como diferentes alternativas en combinación con las modificaciones en las cadenas pesadas-livianas (intercambio/reemplazo VH y VL en un brazo de unión y la  
45 introducción de sustituciones de aminoácidos cargados por otros con la carga opuesta en la interfase CH1/CL) en los anticuerpos de acuerdo con la invención que reduce el emparejamiento erróneo de las cadenas livianas, por ej., productos del tipo Bence-Jones.

50 En una realización preferida de la invención (en caso de que el anticuerpo de acuerdo con la invención comprenda a los dominios CH3 en las cadenas pesadas) los dominios CH3 de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención pueden alterarse mediante la tecnología de "botón-en-oyal" la cual está descrita en detalle con varios ejemplos en por ej., WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; WO98/ 050431. En este método las superficies de interacción de los dos

dominios CH3 se alteraron para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) pueden ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal".

5 Por consiguiente en una realización dicho anticuerpo de acuerdo con la invención (comprende a un dominio CH3 en cada cadena pesada y) es adicionalmente caracterizado porque el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada del anticuerpo en a) y el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada del anticuerpo en b) se juntan en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo; en donde dicha interfase está alterada para promover la formación del anticuerpo de acuerdo con la invención, en donde la alteración está caracterizada porque:

10 i) el dominio CH3 de una cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original el dominio CH3 de una cadena pesada que se junta con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral de volumen más grande, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se posiciona en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada y

15 ii) el dominio CH3 de la otra cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que se junta con la interfase original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo de acuerdo con la invención, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral de volumen más pequeño, generando una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro de la cual se posiciona una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

20 Preferentemente dicho residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral con volumen mayor es seleccionado entre el grupo constituido por arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

En un aspecto de la invención ambos dominios CH3 están adicionalmente alterados mediante la introducción de una cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, para que pueda formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

25 Otras técnicas para las modificaciones del CH3 para favorecer la heterodimerización son contempladas como alternativas de la invención y descritas por ej., en WO96/27011, WO98/050431, EP1870459, WO2007/110205, WO2007/147901, WO2009/089004, WO2010/129304, WO2011/90754, WO2011/143545, WO2012/058768, WO2013/157954, WO2013/157953, WO2013/096291.

30 En una realización el anticuerpo de acuerdo con la invención es del isotipo IgG2 y la aproximación de la heterodimerización descrita en WO2010/129304 puede usarse alternativamente.

35 El término "anticuerpo" incluye por ej., anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos manipulados genéticamente (anticuerpos variantes o mutantes) siempre que sus propiedades características se conserven. Especialmente preferidos, son los anticuerpos humanos o humanizados, especialmente como anticuerpos recombinantes humanos o humanizados. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición del anticuerpo monoclonal" tal como se lo utiliza aquí se refieren a una preparación de las moléculas del anticuerpo de una única composición aminoacídica.

40 Los términos "anticuerpo biespecífico" y "anticuerpo de acuerdo con la invención" tal como se utilizan aquí, se refieren a un anticuerpo en el cual uno de los dos pares de cadenas pesadas y cadenas livianas (HC/LC) se une específicamente al BCMA y el otro se une específicamente al CD3 o preferentemente al CD3 y al BCMA. El término "valente" tal como se lo utiliza dentro de la presente aplicación denota la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula del anticuerpo. Un anticuerpo bivalente de acuerdo con esta invención tiene dos sitios de unión, uno para el CD3 y el otro para BCMA. Como tal, el término "trivalente", denota la presencia de tres sitios de unión en un anticuerpo de acuerdo con la invención, los cuales son dos sitios de unión para el BCMA y un sitio de unión para el CD3.

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

En los mamíferos, hay dos tipos de cadenas livianas, las cuales son llamadas lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Una cadena liviana tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante CL y un dominio variable VL. La longitud aproximada de una cadena liviana es de 211 a 217 aminoácidos. Preferentemente, la cadena liviana es una cadena liviana kappa ( $\kappa$ ), y el dominio constante CL es preferentemente derivado de una cadena liviana kappa (K) (el dominio constante CK). Preferentemente, los dominios constantes de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de acuerdo con la invención son dominios humanos.

Los "anticuerpos" de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier clase (por ej., IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, preferentemente IgG o IgE), o subclase (por ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, preferentemente IgG1), por lo que ambos anticuerpos, a partir de los cuales derivan los anticuerpos biespecíficos bivalentes de acuerdo con la invención, tienen una porción Fc de la misma subclase (por ej., IgG1, IgG4 y similares, preferentemente IgG1), preferentemente del mismo alotipo (por ej., Caucásico).

Un "fragmento Fab de un anticuerpo" tal como se lo utiliza aquí es un fragmento de un anticuerpo que se une a los antígenos. Un fragmento Fab de un anticuerpo consiste en dos pares de dominios. En un anticuerpo salvaje está compuesto por un dominio constante y uno variable de la cadena pesada (CH1 y VH) y de la cadena liviana (CL y VL). De acuerdo con la invención, tales pares de dominios pueden ser, debidos a un entrecruzamiento, también VH-CL y VL-CH1. En un anticuerpo salvaje, de acuerdo con la invención, los dominios de los pares de dominios de la cadena pesada y liviana de un fragmento Fab no están químicamente unidos entre sí y por lo tanto no son scFvs (fragmentos variables de cadena única). De acuerdo con la invención, "entrecruzamiento" significa que preferentemente en un Fab los dominios VL y VH son reemplazados unos por otros.

El término "sustitución aa o variante de carga" tal como se lo utiliza aquí, significa una sustitución aminoacídica de acuerdo con la invención, en la que el aminoácido de la posición 124 del dominio constante CL es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el respectivo dominio constante CH1 el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 está sustituido independientemente por ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D), y preferentemente además en el dominio constante CL el aminoácido en la posición 123 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) y preferentemente por arginina (R).

Una combinación preferida de sustituciones aa es Q124K, E123R, K147E y K213E (por ejemplo: E123R significa que el ácido glutámico (E) en la posición 123 es reemplazado por arginina (R)).

La "porción Fc de un anticuerpo" es un término ampliamente conocido por los expertos en el área y está definido en base al clivaje de los anticuerpos con papaína. Los anticuerpos, de acuerdo con la invención, contienen una porción Fc, preferentemente una porción Fc de origen humano y preferentemente todas las otras partes de las regiones constantes humanas. La porción Fc de un anticuerpo está directamente implicada en la activación del complemento, la unión al C1q y la unión al receptor Fc. Si bien la influencia de un anticuerpo sobre el sistema de complemento es dependiente de ciertas condiciones, la unión al C1q es producida mediante los sitios de unión definidos en la porción Fc. Tales sitios de unión son ampliamente conocidos en el área y está descritos por ej., por

Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; and EP 0 307 434. Tales sitios de unión son por ej., L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat, ver más abajo). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 usualmente activan al complemento, se unen al C1q y activan al C3, mientras que la IgG4 no activa al sistema de complemento, no se une al C1q y no activa al C3. Preferentemente, la porción Fc de una porción Fc humana. Preferentemente, la porción Fc es una porción Fc de IgG1 humana. Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende en la porción Fc de la IgG1 humana la sustitución aminoacídica Pro329 con glicina o arginina y/o las sustituciones L234A y L235A, preferentemente Pro329 con glicina y las sustituciones L234A y L235A.

Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende como porción Fc a una variante Fc de una región Fc de IgG humana salvaje, dicha variante Fc comprende a una sustitución aminoacídica en la posición Pro329 y al menos una sustitución aminoacídica más, en donde los residuos están numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat, y en donde dicho anticuerpo exhibe una reducida afinidad al Fc $\gamma$ R1IIIA y/o Fc $\gamma$ R1IIA y/o Fc $\gamma$ R1 humanos en comparación con un anticuerpo que comprende a la región Fc de IgG salvaje, y en donde la ADCC inducida por dicho anticuerpo está disminuida en al menos un 20% de la ADCC inducida por el anticuerpo que comprende una región Fc de IgG humano salvaje. En una realización específica la Pro329 de una región Fc humana salvaje en el anticuerpo de acuerdo con la invención está sustituida con glicina o arginina o con un residuo aminoacídico que sea lo suficientemente grande como para destruir el sándwich de prolina dentro de la interfase del receptor Fc/Fc $\gamma$ , que está formada entre la prolina 329 del Fc y los residuos de triptófano Trp 87 y Trp 110 del Fc $\gamma$ R1III (Sondermann et al.: *Nature* 406, 267-273 (20 July 2000)). En un aspecto adicional de la invención, al menos una sustitución aminoacídica adicional en la variante Fc es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, o P331S y aún en otra realización dicha al menos sustitución aminoacídica adicional es L234A (que denota que la leucina 234 está sustituida por alanina) y L235A de la región Fc de la IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de la IgG4 humana. Tales variantes Fc están descritas en detalle en WO2012130831.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende a la región variable, es decir, a la región de unión, a partir de una fuente o especie y al menos una porción de la región constante derivada a partir de una fuente o especie diferente, usualmente preparado mediante las técnicas del ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden a una región variable murina y a una región constante humana son los preferidos. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" abarcadas por la presente invención son aquellos en los cuales la región constante fue modificada o cambiada a partir de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en cuanto a la unión al C1q y/o al receptor Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos son también referidos como "anticuerpos cambiados de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de la expresión de los genes de inmunoglobulinas abarcados en los segmentos del ADN que codifican para las regiones variables de las inmunoglobulinas y en los segmentos del ADN que codifican para las regiones constantes de las inmunoglobulinas. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican a las técnicas convencionales de transfección de genes o de ADN recombinante ampliamente conocidas en el área. Ver, por ej., Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; US PatentNos. 5, 202, 238 y 5, 204, 244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a los anticuerpos en los cuales las regiones framework o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) fueron modificadas para comprender a la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, una CDR murina se inserta en la región framework de un anticuerpo humano para preparar al "anticuerpo humanizado". Ver por ej., Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; and Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Particularmente, las CDR preferidas corresponden a aquellas que representan las secuencias que reconocen a los blancos mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcados por la presente invención son aquellos en los cuales la región constante fue adicionalmente modificada o cambiada a partir de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en cuanto a la unión al C1q y/o al receptor de Fc (FcR).

El término "anticuerpo humano", tal como se lo utiliza aquí, pretende incluir a los anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son ampliamente conocidos en el área (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos en animales transgénicos (por ej., ratón) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de



anticuerpos humanos en ausencia de la producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia del arreglo del gen de la inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones que poseen mutada tal línea germinal, resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el desafío con el antígeno blanco (ver por ej., Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en librerías de phage display (Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. están disponibles para la preparación de los anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985); y Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Como ya se ha mencionado para los anticuerpos quiméricos y humanizados, de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano" tal como se utiliza aquí también comprende a tales anticuerpos que son modificados en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente en cuanto a la unión al C1q y/o con FcR, por ej., mediante "el cambio de clase", es decir, cambio o mutación de las porciones Fc (por ej., de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

El término "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza aquí, pretende incluir a todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de las células hospederas, tales como las células NSO o CHO o a partir de un animal (por ej., ratón) transgénico para los genes de inmunoglobulinas humanas o a los anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula hospedera. Tales anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables y constantes reordenadas. Los anticuerpos recombinantes humanos, de acuerdo con la invención fueron sujetos a la hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias, que de ser derivadas a partir de o estar relacionadas a las secuencias VH y VL de las líneas germinales humanas, pueden no existir naturalmente in vivo dentro del repertorio de los anticuerpos de las líneas germinales.

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena liviana (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza aquí denota cada uno de los pares de cadenas livianas y pesadas que están implicados directamente en la unión del anticuerpo al blanco. Los dominios variables de las cadenas livianas y pesadas humanas tienen la misma estructura y cada dominio comprende cuatro regiones framework (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones framework adoptan una conformación lámina- $\beta$  y las CDR pueden formar loops que conectan con la lámina- $\beta$ . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional mediante las regiones framework y forman juntos con las CDR de la otra cadena el sitio de unión al blanco. Las regiones CDR3 de las cadenas livianas y pesadas del anticuerpo juegan un rol importante en lo que es la especificidad/afinidad de la unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por consiguiente proporcionan otro objeto de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de un anticuerpo que se une al blanco" cuando se utilizan aquí se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de unirse al blanco. La región hipervariable comprende a los residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las regiones "framework" (armazón) o "FR" son aquellas regiones con dominios variables distintas a los residuos de las regiones hipervariables definidas aquí. Por consiguiente, las cadenas livianas y pesadas de un anticuerpo comprenden desde su N-terminal al C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las CDRs de cada cadena se encuentran separadas por tales aminoácidos de las regiones framework. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión con el blanco. Las regiones CDR y FR están determinadas de acuerdo con la definición estándar de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., PublicHealth Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

El término "epítotope" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el epítotope incluye grupos químicamente activos presentes en la superficie de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos y sulfonilos, y en ciertas realizaciones, pueden presentar características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítotope es una región de un blanco que se une a un anticuerpo.

Para la preparación de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, se podrían utilizar vectores separados que codifican cada cadena liviana y pesada u otra cantidad apropiada de vectores, Tales vectores pueden usarse para transformar las células hospederas.

El término "ácido nucleico o molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, pretende incluir a las moléculas de ADN y a las moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser simple cadena o doble cadena, pero preferentemente es ADN doble cadena.

5 Tal como se utiliza aquí, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan intercambiamente y todas estas designaciones incluyen a la progenie. Por consiguiente, las palabras "transformantes" y "células transformadas", incluyen a los cultivos celulares primarios y a los cultivos celulares que derivan de estas, sin considerar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. La progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que se pesquisa en la célula originalmente transformada también se incluye.  
10 Cuando se pretendan distintas designaciones, quedará claro a partir del contexto.

El término "transformación" tal como se utiliza aquí se refiere al proceso de transferencia de un vector/ácido nucleico a una célula hospedera. Si se utilizan como células hospederas, células sin pared celular como barrera formidable, la transfección se lleva a cabo mediante por ej. el método de la precipitación con fosfato de calcio, tal como es descrito por Graham and Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Sin embargo, otros métodos para introducir al ADN en las células como la inyección nuclear o como la fusión de protoplastos, también pueden ser usados. Si se utilizan células procariontas o células que contengan una pared celular sustancial, por ej. un método de transfección es el tratamiento con calcio usando cloruro de calcio, tal como está descrito por Cohen SN, et al, *PNAS* 1972, 69 (8):2110-2114.

20 La producción de anticuerpos recombinantes mediante transformación es ampliamente conocida en el área y es descrita, por ejemplo en los artículos de revisión de Makrides, S. C, *Proteína Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Proteína Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., et al., *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880 así como también en US6331415 y US4816567.

25 Tal como se utiliza aquí, "expresión" se refiere al proceso por el cual un ácido nucleico se transcribe a ARNm y/o al proceso por el cual el ARNm transcrito (también referido como transcripto) es subsiguientemente traducido a péptido, polipéptido o proteína. Los transcriptos y los polipéptidos codificados son colectivamente referidos como un producto génico. Si el polinucleótido deriva del ADN genómico, la expresión en una célula eucariota puede incluir el splicing del ARNm.

30 Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular auto-replicativa, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada dentro y/o entre células hospederas. El término incluye a vectores que funcionan primariamente para insertar el ADN o ARN en una célula (ej., integración cromosómica), replicación de los vectores que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También incluye vectores que proporcionan más de una de las funciones descritas.

35 Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula hospedera apropiada, puede ser transcrito y traducido en un polipéptido. Un "sistema de expresión" se refiere usualmente a una célula hospedera adecuada que comprende a un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

40 Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención están preferentemente producidos por medios recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos y comprenden a la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con el aislamiento subsiguiente del polipéptido del anticuerpo y usualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de la proteína, los ácidos nucleicos que codifican para las cadenas livianas y pesadas o sus fragmentos, se insertaron en vectores de expresión por métodos estándares. La expresión se llevó a cabo en células hospederas apropiadas como las células CHO, las células NSO, las células SP2/0, las células HEK293, las células COS, las células de levadura, o las células de E.coli, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o después de la lisis celular). Los anticuerpos biespecíficos pueden estar presentes en células enteras, en lisados celulares, o en una forma parcialmente o sustancialmente purificada. La purificación se llevó a cabo para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ej., otros ácidos nucleicos celulares o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen al tratamiento

alcalino/con SDS, la cromatografía en columnas y otros ampliamente conocidos en el tema. Ver Ausubel, F., et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

5 La expresión en las células NS0 está descrita por ej., Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria está descrita por ej., por Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de los dominios variables está descrita por Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitorio preferido (HEK293) está descrito por Schlaeger, E.- J., and Christensen, K., in *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.-J., in *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

10 Las secuencias control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen a un promotor, opcionalmente a una secuencia del operador, y a un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, enhancers y señales de poliadenilación.

15 El ácido nucleico es "operablemente unido" cuando se lo coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o para la señal secretoria está operablemente unido al ADN para un polipéptido, si es expresado como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un enhancer está operablemente unido a la secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia, o el sitio de unión al ribosoma está operablemente unido a la secuencia codificante si está posicionado de tal manera que facilita la traducción. Generalmente, "unido operablemente" significa que

20 las secuencias de ADN a unirse son contiguas, y en el caso de la señal secretoria, contigua y en marco de lectura. Sin embargo, los enhancers no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante la ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o linkers son usados de acuerdo con las prácticas convencionales.

25 Los anticuerpos biespecíficos son adecuadamente separados del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. El ADN o ARN que codifica para los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de tales ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN puede ser insertado en vectores de expresión, que luego se van a transfectar en células hospederas tales como las células HEK293, las células CHO, o las células de mieloma que de otra manera no producirían proteínas de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospederas.

30

35 Las variantes de la secuencia de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo biespecífico se prepararon mediante la introducción de los cambios nucleotídicos adecuados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis nucleotídica. Tales modificaciones pueden ser llevadas a cabo, sin embargo, solamente en un rango muy limitado, por ej., según lo descrito más arriba. Por ejemplo, las modificaciones no deben alterar las características del anticuerpo anteriormente mencionadas, tales como el isotipo IgG y el blanco de unión, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad proteica o facilitar la purificación.

40 Los aglutinantes biespecíficos de células T (TCB) tienen una potencia para matar a las células dependiente de la alta concentración/ocupación del receptor en las células tumorales (por ej., los valores de EC50 in vitro en los ensayos de muerte celular están en un orden por debajo del de los picomolares; Dreier et al. *Int J Cancer* 2002). Los aglutinantes específicos de células T (TCB) se administran en dosis mucho menores que los anticuerpos convencionales monoespecíficos. Por ejemplo, el blinatumomab (CD19xCD3) se administra por vía intravenosa a una dosis continua 5 a 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  (es decir, solo 0,035 a 0.105  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ ) para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda o 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  para el tratamiento del linfoma no-Hodgkin, y las concentraciones séricas a estas dosis están en el rango de 0,5 a 4  $\text{ng}/\text{ml}$  (Klinger et al., *Blood* 2012; Topp et al., *J Clin Oncol* 2011; Goebeler et al. *Ann Oncol* 2011). Dado que las dosis bajas de TCB pueden ejercer una alta eficacia en pacientes, se prevé que para un anticuerpo de acuerdo con la invención sea posible y preferible a nivel clínico la administración subcutánea (preferentemente en el rango de dosis de 0,25 a 2,5  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ ). Pese a estas bajas concentraciones/dosis/ocupaciones del receptor, los TCB pueden causar efectos adversos considerables (Klinger et

45

5 al., Blood 2012). Por consiguiente, es crítico controlar la ocupación/cobertura de las células tumorales. En los pacientes con niveles séricos altos y variables de APRIL y BAFF (por ej., pacientes con mieloma múltiple, Moreaux et al. 2004; Blood 103(8): 3148-3157) el número de TCB unidos a las células tumorales, resp. la ocupación de las células tumorales puede estar considerablemente influenciada por APRIL (ligando de alta afinidad que se une al BCMA humano con una afinidad 1.000 veces mayor que BAFF). Pero mediante el uso de dicho anticuerpo de esta invención, para la ocupación de las células tumorales respectivamente la eficacia/seguridad puede no ser necesario aumentar la dosis de un anticuerpo de acuerdo con esta invención dado que dicho anticuerpo puede no estar afectado por la competencia con el ligando APRIL. Otra ventaja de anticuerpo de acuerdo con la invención está en relación con la inclusión de una porción Fc, que aumenta la vida media de eliminación hasta 12 días e incluso más y ofrece la oportunidad de que se administre una o dos veces/semana en comparación con los TCB que no contienen la porción Fc (por ej., blinatumomab), que requieren ser administrados por vía intravenosa y continuamente mediante una bomba que deben llevar los pacientes.

15 Con el anticuerpo biespecífico de células T (TCB) CD19xCD3 blinatumomab se observó una tasa de respuesta de hasta el 80% en los pacientes con Leucemia Linfocítica Aguda ALL refractaria o que sufrieron de una recaída. Como en ALL, para el MM y otras enfermedades de las células plasmáticas, todavía existe una gran necesidad médica. A pesar del tratamiento actualmente disponible, aprox. el 60% de los pacientes con Mieloma Múltiple muere a los cinco años de haber sido diagnosticados. Existe todavía una necesidad para un tratamiento efectivo para los pacientes con Mieloma Múltiple.

20 Los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen características únicas y ventajas con respecto a por ej. el blinatumomab y a los anticuerpos TCB BCMAxCD3 publicados:

- vida media de eliminación más prolongada (días en vez de horas)
- administración más conveniente de dos veces o una vez por semana (en vez de la administración mediante una bomba que tiene que llevar el paciente por semanas/meses)
- 25 - mínima influencia de las concentraciones en sangre y en médula ósea de APRIL, el ligando natural del BCMA, sobre la muerte de las células tumorales inducida por los TCB-BCMA (los pacientes con mieloma múltiple presentan una gran variabilidad en las concentraciones de APRIL, los pacientes con altos niveles de APRIL pueden experimentar una eficacia reducida de la droga o incluso no experimentar ninguna eficacia si la eficacia depende fuertemente de los niveles de APRIL)
- 30 - el formato y la estructura molecular proporcionan una alta estabilidad y una baja agregación a los anticuerpos TCB BCMAxCD3
- optimización de la estructura molecular para favorecer una fabricación de alta calidad y para facilitar la purificación mediante las siguientes medidas:
  - sustituciones aa en CL y CH1 para reducir los apareamientos erróneos de las cadenas livianas
  - entrecruzamiento VL-VH para reducir los apareamientos erróneos de las cadenas livianas
- 35 preferentemente se usó la tecnología de botón en ojal para mejorar el apareamiento de las cadenas pesadas
- Preferentemente las sustituciones aminoácidas Pro 329 y L234A y L235A en el CH3 del Fc para evitar potenciales efectos colaterales por la interacción con el sistema del complemento y/o con los FcR presentes en las células efectoras.

**Tabla 1: Secuencias de anticuerpo**

	SEQ ID NO:							
Anticuerpo BCMA	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
83A10	15	18	21	24	27	30	33	36
17A5	16	19	22	25	28	31	34	37
13A4	17	20	23	26	29	32	35	38

**Tabla 2: Construcciones adicionales**

Construcción	SEQ ID NO:
BCMA 83A10 VH_CH1 x CD3 VH_CL Fc botón LALA PG	39
BCMA 83A10 HC ojal LALA PG	40
CD3 VL_CH1	41
BCMA 83A10 hum IgG1 LC	42
BCMA 83A10 VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc botón LALA PG	43
BCMA 83A10cv HC ojal LALA PG	44
CD3 VH_CL	45
BCMA 83A10cv hum IgG1 LC	46
BCMA 17A5 VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc botón LALA PG	47

BCMA 17A5cv HC ojal LALA PG	48
BCMA 17A5cv hum IgG1 LC	49
BCMA 13A4 VH_CH1 cv x CD3 VL_CH1 Fc botón LALA PG	50
BCMA 13A4cv HC ojal LALA PG	51
BCMA 13A4cv hum IgG1 LC	52

Para hacer los siguientes TCB anti-BCMA/anti-CD3 que contienen al Fc en formato (2+1) Fc, los respectivos "bloques de construcción" / secuencias ID según lo mencionado en la Tabla 2 de arriba son necesarias:

83A10-TCB: 39, 40, 41, 42 (comparación)

5 83A10-TCBcv: 43, 44, 45, 46 (Figura 2A)

17A5-TCBcv: 45, 47, 48, 49 (Figura 2A)

13A4-TCBcv: 45, 50, 51, 52 (Figura 2A)

**Tabla 3: reemplazos aa en las CDR**

Sustitución aa	SEQ ID NO:			
	CDR original	CDR variante	VL/VH original	VL/VH variante
N95S	29	53	17	54
N95T	29	55	17	56
N95E	29	57	17	58
N95Q	29	59	17	60
N95A	29	61	17	62

ES 2 602 051 T3

N95G	29	63	17	64
G96A	29	65	17	66
G96E	29	67	17	68
G96Q	29	69	17	70
N27fS	32	71	20	72
N27fT	32	73	20	74
N27fE	32	75	20	76
N27fQ	32	77	20	78
N27fA	32	79	20	80
N27fG	32	81	20	82
G28A	32	83	20	84
G28E	32	85	20	86
G28Q	32	87	20	88
D54S	26	89	17	90
D54T	26	91	17	92
D54E	26	93	17	94
D54Q	26	95	17	96
D54A	26	97	17	98
D54G	26	99	17	100
S55A	26	101	17	102

ES 2 602 051 T3

S55E	26	103	17	104
S55Q	26	105	17	106
W33F	23	107	17	108
W33Y	23	109	17	110
W33V	23	111	17	112
W33I	23	113	17	114
W33L	23	115	17	116
W33A	23	117	17	118
W98F	27	119	15	120
W98Y	27	121	15	122
W98V	27	123	15	124
W98I	27	125	15	126
W98L	27	127	15	128
W98A	27	129	15	130

En las siguientes realizaciones específicas de la revelación se enumeran:

- 5 1. Un anticuerpo biespecífico bi-o trivalente que se une específicamente a los dos blancos que son el dominio extracelular del antígeno de maduración de células B humano (posteriormente también llamado "BCMA") y el CD3ε (posteriormente también llamado "CD3"), en donde los dominios variables VL y VH en una cadena liviana y la respectiva cadena pesada se reemplazaron una por otra, caracterizado porque comprende un dominio constante CL en donde el aminoácido en la posición 124 está sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat).
- 10 2. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los blancos que son el dominio extracelular del BCMA humano y el CD3 humano, caracterizado porque comprende
  - a) la primera cadena liviana y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA; y



- b) la segunda cadena liviana y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente al CD3, y en donde los dominios variables VL y VH en la segunda cadena liviana y en la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo son sustituidos uno por otro; y en donde
- 5 c) en el dominio constante CL de la primera cadena liviana en a) el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).
- 10 3. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos blancos que son el dominio extracelular del BCMA humano y el CD3 humano, que se caracterizan por comprender a
- a) la primera cadena liviana y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA; y
- 15 b) la segunda cadena liviana y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente al CD3, y en donde los dominios variables VL y VH en la segunda cadena liviana y en la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo son sustituidos uno por otro; y en donde
- 20 c) en el dominio constante CL de la segunda cadena liviana en b) el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).
4. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la realización 2, caracterizado porque
- 25 dicho anticuerpo biespecífico comprende además un fragmento Fab de dicho primer anticuerpo (también llamado "BCMA-Fab") y en el dominio constante CL de dicho BCMA-Fab el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de dicho BCMA-Fab el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).
5. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la realización 3 de arriba, caracterizado porque
- 30 dicho anticuerpo biespecífico comprende además un segundo fragmento Fab de dicho primer anticuerpo ("BCMA-Fab").
6. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de la realización 1, caracterizado porque consiste en un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente al CD3 (posteriormente denominado también como "CD3-Fab"), y un fragmento Fab de un anticuerpo que se une específicamente al BCMA (posteriormente denominado también como "BCMA-Fab(s)") y una porción Fc, en donde el CD3-Fab y el BCMA-Fab están unidos vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y en donde el CD3-Fab o el BCMA-Fab comprende una sustitución aa y el CD3-Fab comprende un entrecruzamiento.
- 35 7. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la realización 6, caracterizado porque consiste en un CD3-Fab, y un BCMA-Fab y una porción Fc, en donde el CD3-Fab y el BCMA-Fab están unidos vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y un segundo BCMA-Fab, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal del CD3-

Fab y en donde el CD3-Fab comprende un entrecruzamiento y el CD3-Fab o ambos BCMA-Fab comprenden una sustitución aa (Figuras 2A y 2B).

- 5 8. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la realización 7, caracterizado porque consiste en BCMA-Fab-Fc-CD3-BCMA-Fab-Fab, en donde ambos BCMA-Fabs comprenden una sustitución aa y el CD3-Fab comprende a un entrecruzamiento VL/VH.
9. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la realización 1, caracterizado porque consiste en dos BCMA-Fab y una porción Fc, en donde los BCMA-Fab están unidos vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y una CD3-Fab, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal de un BCMA-Fab y el CD3-Fab comprende a un entrecruzamiento, y el CD3-Fab o ambos BCMA-Fab comprenden a una sustitución aa (Figuras 2C y 2D).
- 10 10. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, caracterizado porque consiste en un CD3-Fab, que está unido vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y un BCMA-Fab, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal del CD3-Fab y el CD3-Fab o el BCMA-Fab comprenden a una sustitución aa (Figuras 3A y 3B).
- 15 11. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque consiste en un BCMA-Fab, que está unido vía su C-terminal a la región bisagra de dicha porción Fc y un CD3-Fab, que está unido mediante su C-terminal al N-terminal del BCMA-Fab y el CD3-Fab o el BCMA-Fab comprenden a una sustitución aa (Figuras 3C y 3D).
12. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende a las secuencias CDR del anticuerpo anti-BCMA 83A10, 17A5 o 13A4.
- 20 13. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende a las secuencias VH y VL del anticuerpo anti-BCMA 83A10, 17A5 o 13A4, o a un anticuerpo que comprende las secuencias VH, VL, CH1 y CL del anticuerpo anti-BCMA 83A10, 17A5 o 13A4.
- 25 14. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque la porción del anticuerpo que se une específicamente al CD3 humano, preferentemente el fragmento Fab es caracterizado porque comprende a un dominio variable VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas, y el dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas livianas, del anticuerpo anti CD3ε (CDR MAB CD3).
- 30 15. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque la porción del anticuerpo que se une específicamente al CD3 humano es caracterizado porque los dominios variables son de SEQ ID NO:7 y 8 (VHVL MAB CD3).
- 35 16. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque el fragmento Fab que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un dominio variable VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas CDR1H de SEQ ID NO:21, una CDR2H de SEQ ID NO:24, una CDR3H de SEQ ID NO: 27 y comprende a un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas CDR1L de SEQ ID NO:30, una CDR2L de SEQ ID NO:33, una CDR3L de SEQ ID NO: 36 (CDR MAB 83A10).
- 40 17. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque el fragmento Fab que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un dominio VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas CDR1H de SEQ ID NO:22, una CDR2H de SEQ ID NO:25, una CDR3H de SEQ ID NO: 28 y un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas CDR1L de SEQ ID NO:31, una CDR2L de SEQ ID NO:34, una CDR3L de SEQ ID NO: 37 (CDR MAB 17A5) .

- 5 18. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque el fragmento Fab que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un dominio VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas CDR1H de SEQ ID NO:23, una CDR2H de SEQ ID NO:26, una CDR3H de SEQ ID NO: 29 y a un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas CDR1L de SEQ ID NO:32, una CDR2L de SEQ ID NO:35, una CDR3L de SEQ ID NO: 38 (CDR MAB 13A4).
19. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque el fragmento Fab que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un VH de SEQ ID NO: 15 y un VL de SEQ ID NO: 18 (VHVL MAB 83A10).
- 10 20. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque el fragmento Fab que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un VH de SEQ ID NO: 16 y un VL de SEQ ID NO: 19 (VHVL MAB 17A5).
21. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, caracterizado porque el fragmento Fab que se une específicamente al BCMA humano es caracterizado porque comprende a un VH de SEQ ID NO: 17 y un VL de SEQ ID NO: 20 (VHVL MAB 13A4).
- 15 22. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 21, caracterizado porque además de la sustitución aminoacídica en la posición 124 en el dominio constante (CL), el aminoácido en la posición 123 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H).
23. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22, caracterizado porque el aminoácido 124 es K, el aminoácido 147 es E, el aminoácido 213 es E, y el aminoácido 123 es R.
- 20 24. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al dominio extracelular del BCMA humano y al CD3ε humano, caracterizado porque comprende un set de cadenas pesadas y livianas seleccionado entre el grupo constituido por los polipéptidos
- i) SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, y SEQ ID NO:46 (set 1),
- ii) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, y SEQ ID NO:49 (set 2), y
- 25 iii) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, y SEQ ID NO:52 (set 3).
- 30 25. Un anticuerpo, de acuerdo con la realización 24, caracterizado porque en la porción del anticuerpo que se une específicamente al CD3ε, el dominio variable VH es sustituido por el dominio variable VH que comprende a las CDR de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas, y el dominio variable VL es sustituido por un dominio variable VL que comprende las CDR de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas livianas, del anticuerpo anti CD3ε.
26. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 25, caracterizado porque el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se juntan en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo; en donde dicha interfase está alterada para promover la formación del anticuerpo biespecífico, en donde la alteración está caracterizada porque:
- 35 a) el dominio CH3 de una cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original el dominio CH3 de una cadena pesada que se junta con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral

de volumen más grande, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se posiciona en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada y

- 5 b) el dominio CH3 de la otra cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que se junta con la interfase original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral de volumen más pequeño, generando una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro de la cual se posiciona una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.

27. Un método para la preparación de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26 que comprende a las etapas de

- 10a) transformar una célula hospedera con vectores que comprenden a moléculas de ácido nucleico que codifican para una cadena liviana y una cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26,  
b) cultivar la célula hospedera bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y  
c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

15

28. Una célula hospedera que comprende a los vectores que comprenden a las moléculas de ácido nucleico que codifican para la cadena liviana y la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26.

- 20 29. Una composición farmacéutica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26 y a un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de la realización 29 para su uso como un medicamento.

31. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de la realización 29 para su uso como un medicamento para el tratamiento de desórdenes de las células plasmáticas.

- 25 32. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de la realización 29 para su uso como un medicamento para el tratamiento del mieloma múltiple.

33. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de la realización 29 para el tratamiento de desórdenes de las células plasmáticas como el mieloma múltiple u otros desórdenes de las células B en donde se exprese el BCMA.

- 30 34. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 25, caracterizado porque comprende en la porción Fc de la IgG1 humana la sustitución aminoacídica de la Pro329 por glicina o arginina y/o las sustituciones L234A y L235A.

Los siguientes ejemplos, el listado de secuencias y las figuras se proporcionan para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se establece en las reivindicaciones anexadas.

35

**Materiales & métodos generales*****Técnicas de ADN recombinante***

Se usaron métodos estándar para manipular el ADN, como los descritos en Sambrook, J. et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos de biología molecular se usaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La información general en cuanto a las secuencias nucleotídicas de las cadenas livianas y pesadas de las inmunoglobulinas humanas está descrita en: Kabat, E.A. et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> ed., NIH Publication No. 91-3242. Los aminoácidos de las cadenas de los anticuerpos están numerados y referidos de acuerdo con Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteínas of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

***Síntesis de genes***

a) Los segmentos génicos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos hechos por síntesis química. Los segmentos génicos de 600 - 1800 pb de longitud, que estaban flanqueados por sitios singulares de clivaje de las endonucleasas de restricción, se ensamblaron mediante el annealing y la ligación de los oligonucleótidos incluidos en la amplificación por PCR y subsiguientemente se clonaron vía los sitios de restricción indicados, por ej., KpnI/ Sad o Ascl/Pacl en un vector de clonación pPCRScrip (Stratagene) basado en pGA4. Las secuencias de ADN de los fragmentos génicos subclonados fueron confirmadas mediante secuenciación del ADN. La síntesis de los fragmentos génicos se ordenó de acuerdo con las especificaciones de Geneart (Regensburg, Alemania).

b) Los segmentos génicos deseados cuando fuese necesario o fueron generados mediante PCR usando los templados apropiados o fueron sintetizados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis automatizada de genes. Los segmentos génicos flanqueados por los sitios singulares de clivaje de las endonucleasas de restricción se clonaron en vectores de expresión estándar o en vectores de secuenciación para su posterior análisis. El ADN plasmídico se purificó a partir de las bacterias transformadas usando equipos comerciales de purificación de plásmidos. La concentración plasmídica se determinó mediante espectroscopia al UV. La secuencia del ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó mediante la secuenciación del ADN. Los segmentos génicos fueron diseñados con los sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Si es necesario, los genes que codifican para las proteínas se diseñaron con una secuencia de ADN en el extremo 5' terminal que codifica para un péptido señal que dirige a las proteínas para ser secretadas en las células eucariotas.

***Determinación de la secuencia de ADN***

Las secuencias de ADN se determinaron mediante la secuenciación de las dos cadenas.

***Análisis de las secuencias de ADN y proteína y manejo de los datos de las secuencias***

El paquete del programa Clone Manager (Scientific & Educational Software) version 9.2 se utilizó para el mapeo, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

***Vectores de expresión***

a) Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpo descritas más abajo se generaron mediante PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron usando métodos y técnicas recombinantes conocidas mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ej., usando sitios de restricción únicos. Las secuencias de ácido nucleico subclonadas se verificaron mediante secuenciación del ADN. Para las transfecciones

transitorias, se prepararon grandes cantidades de los plásmidos a partir de los cultivos de *E. coli* transformadas (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

5 b) Para la generación de los vectores de expresión del anticuerpo anti-BCMA, las regiones variables de las secuencias de ADN que codifican para las regiones variables de la cadena pesada y liviana se subclonaron en marco con la cadena pesada constante de las IgG1 humana o la cadena liviana constante de la IgG1 humana pre-  
 10 insertadas en el respectivo vector de expresión genérico optimizado para la expresión en líneas celulares de mamíferos. La expresión del anticuerpo fue conducida por un promotor quimérico del MPSV que comprende al enhancer del CMV y al promotor del MPSV seguido de una región 5'UTR, un intrón y un elemento MAR de Ig kappa. La transcripción es terminada mediante una secuencia señal sintética con poli-A en el extremo 3'terminal de las CDS. Todos los vectores contenían en su extremo 5' una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal para que las proteínas sean secretadas de las células eucariotas. Además, cada vector contiene una secuencia OriP del EBV para la replicación del plásmido episomal en las células que expresan la proteína EBNA del EBV.

15 c) Para la generación de vectores del anticuerpo biespecífico BCMAxCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten en al menos dos motivos de unión al antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y BCMA. Los motivos de unión al antígeno eran los fragmentos Fab compuestos por una cadena pesada y una liviana, cada una comprendiendo a su vez una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab era un fragmento "Fab entrecruzado", en donde los dominios Fab de la cadena pesada y la liviana se intercambiaron. El intercambio de los dominios constantes de la cadena pesada y liviana dentro del fragmento Fab garantiza que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan reordenamientos idénticos en sus dominios. El diseño de la molécula biespecífica fue monovalente para el CD3 y bivalente para el BCMA, donde el fragmento Fab fue fusionado al extremo N-terminal del Fab entrecruzado (2+1) interno. La molécula biespecífica contenía una porción Fc para tener una vida media más prolongada. Una representación esquemática de las construcciones se muestra en las Figuras 2; las secuencias de las construcciones preferidas se muestran en SEQ ID Nos 39 a 52. Las moléculas se lograron producir mediante la con-  
 20 transfeción de las células HEK293-EBNA que crecen en suspensión con los vectores de expresión para células de mamíferos usando una transfección a base de polímeros. Para la preparación de las construcciones IgG1-Fab entrecruzado 2+1, las células se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión ("vector del Fc (botón)" : "vector de la cadena liviana" : "vector del Fab entrecruzado de la cadena liviana" : "vector del Fab entrecruzado de la cadena pesada") en una relación 1:2:1:1.

### 30 **Técnicas de cultivo celular**

Se utilizaron las técnicas estándar de cultivos celulares, tales como las descritas en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

### **Expresión transitoria en células HEK293 (sistema HEK293-EBNA)**

35 Los anticuerpos biespecíficos se expresaron mediante la co-transfección transitoria de los respectivos vectores de expresión para células de mamíferos en las células HEK293-EBNA, que se cultivaron en suspensión, utilizando un método de transfección a base de polímeros. Un día antes de la transfección, se sembraron 1,5 millones de células HEK293-EBNA viables/mL en el medio Ex-Cell, suplementado con 6 mM de L-Glutamina. Por cada mL del volumen final de producción, se centrifugaron 2,0 millones de células viables (5 minutos a 210 x g). Se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µL de medio CD CHO. Por cada mL del volumen de producción final, el ADN se preparó al mezclar 1 µg de ADN (Relación cadena pesada: cadena pesada modificada: cadena liviana: cadena liviana modificada = 1:1:2:1) en 100 µL de medio CD CHO. Después de adicionar 0,27 µL de la solución a base de polímeros (1 mg/mL), la mezcla se vortexeó durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego de los 10 minutos, se juntaron las células resuspendidas y la mezcla que  
 40 contiene la solución a base de polímeros/ADN y luego se transfirieron a un recipiente adecuado y se colocaron en un agitador (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Después de un período de incubación de 3 horas, 800 µL del medio Ex-Cell, suplementado con 6 mM L-Glutamina, 1,25 mM de ácido valproico y 12,5% de Pepsy (50 g/L), se añadieron por cada mL del volumen final de producción. Luego de 24 horas, 70 µL de una solución de alimentación se añadió por cada mL del volumen final de producción. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular fue igual o menor al 70%, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación y se esterilizaron por filtración. Los anticuerpos se purificaron  
 50

mediante un paso de afinidad y uno o dos pasos de pulido, mediante cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión molecular. Cuando fue necesario, se usaron más pasos de pulido. El anticuerpo recombinante anti-BCMA humano y los anticuerpos biespecíficos fueron producidos en suspensión mediante la co-transfección de las células HEK293-EBNA con los vectores de expresión para células de mamíferos usando una transfección a base de polímeros. Las células se transfectaron con dos o cuatro vectores, dependiendo del formato. Para la IgG1 humana, un plásmido codificaba para la cadena pesada y el otro plásmido para la cadena liviana. Para los anticuerpos biespecíficos, se co-transfectaron cuatro plásmidos. Dos de ellos codificaban para las dos cadenas pesadas diferentes y los otros dos codificaban para las dos cadenas livianas diferentes. Un día antes de la transfección, se sembraron 1,5 millones de células HEK293-EBNA viables/mL en el F17 suplementado con 6 mM de L-Glutamina.

### ***Determinación de la proteína***

La determinación de la concentración del anticuerpo se realizó al medir la absorbancia a 280 nm, usando el valor teórico de absorbancia de una solución del anticuerpo al 0,1%. Este valor se basó en la secuencia de aminoácidos y se calculó con el programa GPMW software (Lighthouse data).

### **15 SDS-PAGE**

El sistema de geles pre-fabricados NuPAGE® (Invitrogen) se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usó 10% o 4-12% de geles pre-fabricados de Bis-Tris NuPAGE® Novex® (pH 6,4) y un NuPAGE® MES (geles reducidos, con el buffer de corrida con antioxidante NuPAGE®) o un buffer de corrida con MOPS (geles no reducidos).

### **20 Purificación de la proteína**

#### *Mediante cromatografía de afinidad en proteína A*

Para la etapa de afinidad, el sobrenadante se sembró en una columna de proteína A (HiTrap Proteína A FF, 5 mL, GE Healthcare) equilibrada con 6 CV 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrato de sodio, pH 7,5. Después de la etapa de lavado con el mismo buffer, el anticuerpo se eluyó de la columna en la etapa de elución con 20 mM de fosfato de sodio, 100 mM de cloruro de sodio, 100 mM de Glicina, pH 3,0. Las fracciones con el anticuerpo deseado se neutralizaron inmediatamente con 0,5 M de fosfato de sodio, pH 8,0 (1:10), se juntaron y concentraron por centrifugación. El concentrado se esterilizó por filtración y se procesó por cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de exclusión molecular.

#### *Mediante cromatografía de intercambio catiónico*

Para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, la proteína concentrada se diluyó 1:10 con el buffer de elución usado en la etapa de afinidad y se sembró en una columna de intercambio catiónico (Poros 50 HS, Applied Biosystems). Después de dos pasos de lavado con el buffer para equilibrar y el buffer de lavado, respectivamente 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de TRIS, pH 5,0 y 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de TRIS, 100 mM de cloruro de sodio pH 5,0 la proteína se eluyó en un gradiente con 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrate de sodio, 20 mM de TRIS, 100 mM de cloruro de sodio pH 8,5. Las fracciones que contenían al anticuerpo deseado se juntaron, concentraron por centrifugación, se esterilizaron por filtración y se procesaron por cromatografía de exclusión molecular.

#### *Mediante cromatografía de exclusión molecular analítica*

Para la etapa de exclusión molecular, la proteína concentrada se inyectó en una columna XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), y 20 mM de Histidina, 140 mM de Cloruro de Sodio, pH 6,0 con o sin Tween20 como buffer de

formulación. Las fracciones que contenían a los monómeros se juntaron, concentraron por centrifugación y se esterilizó por filtración en un vial estéril.

#### **Medición de la pureza y del contenido de monómeros**

- 5 La pureza y el contenido de monómeros de la preparación proteica final se determinó mediante CE-SDS (Caliper LabChip GXII system (Caliper Life Sciences)) resp. HPLC (columna analítica de exclusión molecular TSKgel G3000 SW XL (Tosoh)) en un buffer con 25 mM de fosfato de potasio, 125 mM de cloruro de sodio, 200 mM de Monoclorhidrato de L-arginina, 0,02 % (w/v) de azida de sodio, pH 6,7.

#### **Confirmación del peso molecular mediante análisis por LC-MS**

##### *Desglicosilación*

- 10 Para confirmar la preparación homogénea de las moléculas en la solución proteica final, se usó una cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS). Para remover la heterogeneidad introducida por los carbohidratos, las construcciones se trataron con PNGasaF (ProZyme). Para ello, se ajustó el pH de la solución proteica a pH 7,0 mediante la adición de 2  $\mu$ l de 2 M de Tris a 20  $\mu$ g de proteína con una concentración de 0,5 mg/ml. Se añadieron 0,8  $\mu$ g de PNGasaF y se incubó durante 12 h a 37 °C.
- 15 *Análisis por LC-MS – Detección on line*

- 20 El método LC-MS se realizó en un HPLC Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). La separación cromatográfica se realizó en una columna de poliestireno Macherey Nagel; RP1000-8 (tamaño de partícula 8  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm; cat. No. 719510). El Eluyente A fue 5 % de acetonitrilo y 0,05 % (v/v) de ácido fórmico en agua, el eluyente B fue 95 % de acetonitrilo, 5 % de agua y 0,05 % de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue 1 ml/min, la separación se llevó a cabo a 40°C y 6  $\mu$ g (15  $\mu$ l) de una muestra de proteína obtenida con el tratamiento descrito anteriormente.

Tiempo (min.)	%B
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100



Durante los primeros 4 minutos, el eluato directamente se desechó para proteger al espectrómetro de masas de la contaminación con sales. La fuente de ionización por electrospray (ESI) se estuvo corriendo con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350°C y una presión de nebulización de 60psi. Los datos del MS se adquirieron con el programa del equipo durante 4 a 17 minutos.

#### 5 ***Aislamiento de todas las células T humanas primarias a partir de las PBMC***

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon por centrifugación por gradiente de densidad con Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de los bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. Brevemente, la sangre se diluyó con PBS estéril y se dispuso cuidadosamente en capas sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, H8889). Después de centrifugar durante 30 min a 450 x g a temperatura ambiente (con el freno apagado), parte del plasma que estaba por encima de la interfase que contiene a las PBMC se descartó. Las PBMC se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL nuevos y los tubos se llenaron con PBS hasta un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 x g (con el freno apagado). Se descartó el sobrenadante y el sedimento con las PBMC se lavó dos veces con PBS estéril mediante centrifugación durante 10 min a 350 x g a 4°C. La población resultante de PBMC se contó de forma automática (ViCell) y se guardó en medio RPMI1640 suplementado con 10% de FCS y 1% de L-alanil-L-glutamina (Biochrom, K0302) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en la estufa hasta el comienzo del ensayo.

El enriquecimiento de células T a partir de las PBMC se llevó a cabo utilizando el equipo comercial Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec #130-091-156), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, los sedimentos celulares se diluyeron en 40 µl de buffer frío por cada 10 millones de células (PBS con 0,5% de BSA, 2 mM de EDTA, esterilizado por filtración) y se incubaron con 10 µl de un cocktail de anticuerpos biotinilados por cada 10 millones de células por 10 min a 4°C. Se añadieron 30 µl de buffer frío y 20 µl de perlas magnéticas anti-Biotina por cada 10 millones de células, y la mezcla se incubó por otros 15 min a 4°C. Las células se lavaron mediante la adición de 10-20x el volumen actual y subsiguientemente se centrifugó a 300 x g durante 10 min. Hasta 100 millones de células se resuspendieron en 500 µl de buffer. La separación magnética de las células T humanas no marcadas se realizó usando columnas LS (Miltenyi Biotec #130-042-401) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población resultante de células T se contó de forma automática (ViCell) y se guardó en el medio AIM-V a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en la estufa hasta el comienzo del ensayo (no más de 24 h).

#### ***Aislamiento de células T vírgenes humanas primarias a partir de las PBMC***

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon por centrifugación por gradiente de densidad con Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas en linfocitos (capas leucocitarias) obtenidas de los bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. El enriquecimiento en células T a partir de PBMC se realizó usando el equipo comercial de aislamiento de T CD8<sup>+</sup> vírgenes de Miltenyi Biotec (#130-093-244), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero salteando el último paso de aislamiento de las células T CD8<sup>+</sup> (ver también la descripción del aislamiento de todas las células T humanas primarias).

#### 35 ***Aislamiento de PBMC primarias de cynomolgus a partir de sangre heparinizada***

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon por centrifugación por gradiente de densidad a partir de sangre fresca de donantes de cynomolgus sanos de la siguiente manera: La sangre heparinizada se diluyó 1:3 en PBS estéril y el medio Lymphoprep (Axon Lab #1114545) se diluyó al 90% con PBS estéril. Dos volúmenes de la sangre diluida se dispusieron en capas sobre un volumen del gradiente de densidad diluido y la fracción de PBMC se separó por centrifugación durante 30 min a 520 x g, sin freno, a temperatura ambiente. La capa de PBMC se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL fresco y se lavó con PBS estéril mediante centrifugación durante 10 min a 400 x g a 4°C. Para remover las plaquetas, se llevó a cabo una centrifugación a baja (15 min a 150 x g, 4°C), y la población resultante de PBMC se contó de forma automática (ViCell) y se utilizó inmediatamente para los ensayos posteriores.

45

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-BCMA**

**Ejemplo 1.1: Producción de los antígenos y las herramientas reactivas**

**Ejemplo 1.1.1: Dominio extracelular de BCMA humano recombinante soluble**

5 Los dominios extracelulares del BCMA humano, de cynomolgus y murino que se usaron como antígenos para las selecciones por phage display se expresaron transitoriamente como una proteína de fusión monomérica en el N-terminal al Fc. en las células HEK-EBNA y se llevó a cabo una biotilación-sitio-específica in vivo mediante la co-expresión de la biotín-ligasa BirA en la secuencia de reconocimiento de etiqueta avi localizada en el extremo C-terminal de la porción Fc que contiene la cadena del receptor (cadena Fc botón). Los dominios extracelulares del  
 10 BCMA humano, de cynomolgus y murino comprendieron de la metionina 4 a la asparagina 53, de la metionina 4 a la asparagina 52, y de la alanina 2 a la treonina 49, respectivamente. Estos se fusionaron por sus extremos N-terminales a la región bisagra de la IgG1 humana permitiendo la heterodimerización con una porción Fc de IgG1 humana no fusionada (cadena ojal) mediante la tecnología de botón en ojal.

Para la recuperación del dominio extracelular del BCMA se usaron los siguientes primers:

15 AAGCTTGGATCCATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCC-3 (SEQ ID NO:9) que incorpora un sitio BamH1 (negrita, subrayado) y

Primer anti-sentido 5-GAATTCGCGCCGCTCATCCTTTCACTGAATTGGTCACACTTGCATTAC-3 (SEQ ID NO:10)

primer 5-ACGTTAGATCTCCACTCAGTCCTGCATCTTGTTCAGTTAAC-3 (SEQ ID NO:11) y primer anti-sentido 5-AACGTTGCGCCGCTAGTTTACAAAACCCAGG-3 (SEQ ID NO:12)

20 GAATTC AAGCTT GCCACCATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCC-3 (SEQ ID NO:13) que incluye el sitio de restricción HindIII (negrita, subrayado) y la secuencia consenso de Kozak y

Primer anti-sentido 5-GAATTCTCTAGATTACCTAGCAGAAATTGATTTCTCTATCTCCGTAGC-3 (SEQ ID NO:14)

**Ejemplo 1.1.2: APRIL recombinante truncada murina**

25 La proteína recombinante murina y truncada APRIL, que se utilizó como herramienta (competidor) en las selecciones del phage display y en los ELISA, se expresó transitoriamente en células HEK-EBNA como una proteína de fusión monomérica en el N-terminal al Fc. La proteína APRIL murina comprendía de la histidina 106 hasta la leucina 241. Se la fusionó por el extremo N-terminal a la región bisagra de una IgG1 humana permitiendo la heterodimerización con una porción Fc de IgG1 humana no fusionada (cadena ojal) mediante la tecnología de botón en ojal.

**Ejemplo 1.2: Células que expresan BCMA como herramientas**

30 **Ejemplo 1.2.1: Células recombinantes que expresan sobre su superficie BCMA humano, cyno o de ratón**

a) Producción de células HEK293-EBNA que expresan transitoriamente al BCMA completo

Las células HEK293-EBNA que expresan transitoriamente al BCMA fueron producidas en suspensión mediante la transfección de las células HEK293-EBNA con los vectores de expresión para células de mamíferos usando una transfección a base de polímeros. Las células se transfectaron con los vectores que contenían al gen que codifica para el BCMA completo ya sea humano, murino o de cynomolgus. Un día antes de la transfección, se sembraron 1,5 millones de células HEK293-EBNA viables/mL en el medio Ex-cell® GTM-3, suplementado con 6 mM de L-Glutamina. Por cada mL del volumen final de producción, se centrifugaron 2,0 millones de células viables (5 minutos a 210 x g). Se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µL de medio CD CHO. Por cada mL del volumen de producción final, el ADN se preparó al mezclar 1 µg de ADN en 100 µL de medio CD CHO. Después de adicionar 0,27 µL de la solución a base de polímeros (1 mg/mL), la mezcla se vortexeó durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego de los 10 minutos, se juntaron las células resuspendidas y la mezcla que contiene la solución a base de polímeros/ADN y luego se transfirieron a un recipiente adecuado y se colocaron en un agitador (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Después de un período de incubación de 3 horas, 800 µL del medio F17, suplementado con 6 mM de L-Glutamina, 1,25 mM de ácido valproico y 12,5% de Pepsoy (50 g/L), se añadieron por cada ml del volumen final de producción. Luego de 24 horas, 70 µL de una solución de alimentación se añadió por cada ml del volumen final de producción. Después de 2 días de incubación, las células HEK293-EBNA transfectadas transitoriamente, se cosecharon por centrifugación (200 \*g; 10 min.). Después de remover el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió suavemente con el medio Ex-cell® GTM-3 a la densidad requerida (30 millones de células/mL). Las células se transfirieron en crioviales (1 mL/vial), y se colocaron en una caja de criopreservación, que fue previamente enfriada a cuatro grados centígrados por al menos 12 horas, y se guardaron a -80 grados centígrados. Después de 72 horas a -80 grados centígrados las células se transfirieron a nitrógeno líquido.

b) Generación de la línea celular CHO que expresa al BCMA

Las líneas celulares CHO que sobre-expresan al BCMA humano, cyno o murino, fueron generadas mediante la transducción con partículas símil virus (VLP). Las partículas símil virus basadas en Lentivirus fueron producidas mediante la co-transfección de las células HEK293T (ATCC CRL11268) con los plásmidos de empaquetamiento lentiviral ViraSafe™ (Cell Biolabs, USA) y los vectores de expresión para lentivirus que codifican para el BCMA ya sea humano, murino o cyno. Las transfecciones de las células HEK293T con los plásmidos se realizaron con Lipofectamina LTX (Life Technologies, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos sembradas con  $6 \times 10^5$  células/pocillo el día anterior a la transfección y con 2,5 µg del ADN plasmídico. Cada transfección contenía 0,4 µg del vector de empaquetamiento pRSV-Rev, 0,4 µg del vector de empaquetamiento pCgpV, 0,4 µg del vector de envoltura pCMV-VSV-G, y 1,3 µg del vector de expresión del BCMA ya sea humano (pETR14305), murino (pETR14304) o cyno (pETR14306). Luego de 48 h, se recolectó el sobrenadante que contenía las VLP y se filtró a través de una membrana de polietersulfona con tamaño de poro de 0,45 µm. Para generar las líneas celulares que expresan en forma estable al BCMA, se sembraron  $1,0 \times 10^6$  células/pocillo de células CHO en placas de 6 pocillos y se superpusieron con 2 mL del sobrenadante que contenía las VLP. Las transducciones se llevaron a cabo mediante spinoculation a 800 x g y a 32 °C por 30 min en una centrífuga de sobremesa Eppendorf 5810 (Eppendorf, Alemania). El sobrenadante viral se reemplazó con medio fresco luego de 12 h de spinoculation. Tres días después de la transducción, se añadió 6 µg/mL de puomicina y las células se cultivaron durante varios pasajes. Mediante FACS sorting (FACS ARIA, Becton, Dickinson and Company, USA) usando un anticuerpo anti-BCMA marcado con Alexa Fluor 448 se obtuvo un pool de células BCMA-positivas.

c) Células recombinantes que expresan establemente sobre su superficie BCMA de cynomolgus

i. Generación de la línea celular HEK293T que expresa establemente al BCMA

Las líneas celulares HEK293T (ATCC CRL11268) que sobre-expresan al BCMA humano o de cynomolgus, fueron generadas mediante la transducción con partículas símil virus (VLP). Las partículas símil virus basadas en Lentivirus fueron producidas mediante la co-transfección de las células HEK293T (ATCC CRL11268) con los plásmidos de empaquetamiento lentiviral ViraSafe™ (Cell Biolabs, USA) y los vectores de expresión para lentivirus que codifican para el BCMA ya sea humano o cyno. Las transfecciones de las células HEK293T con los plásmidos se realizaron con Lipofectamina LTX (Life Technologies, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos sembradas con  $6 \times 10^5$  células/pocillo el día anterior a la transfección y con 2,5 µg del ADN plasmídico. Cada transfección contenía 0,4 µg del vector de empaquetamiento pRSV-Rev, 0,4 µg del vector de empaquetamiento pCgpV, 0,4 µg del vector de envoltura pCMV-VSV-G, y 1,3 µg del vector de expresión del BCMA ya sea humano (pETR14305) o cyno (pETR14306). Luego de 48 h, se recolectó el

sobrenadante que contenía las VLP y se filtró a través de una membrana de polietersulfona con tamaño de poro de 0,45 µm. Para generar las líneas celulares que expresan en forma estable al BCMA, se sembraron  $1,0 \times 10^6$  células/pocillo de células HEK293T en placas de 6 pocillos y se superpusieron con 1 mL del sobrenadante que contenía las VLP. Las transducciones se llevaron a cabo mediante spinoculation a 800 x g y a 32 °C por 30 min en una centrífuga de sobremesa Eppendorf 5810 (Eppendorf, Alemania). El sobrenadante viral se reemplazó con medio fresco luego de 12 h de spinoculation. Tres días después de la transducción, se añadió 6 µg/mL de puomicina y las células se cultivaron durante varios pasajes. Mediante FACS sorting (FACS ARIA, Becton, Dickinson and Company, USA) usando un anticuerpo anti-BCMA humano/cyno (MAB 83A10), y un anticuerpo secundario IgG anti-humano de cabra específico para el Fc gamma conjugado con FITC se obtuvo un clon de células BCMA-positivas.

ii.0 Normalización de la expresión del BCMA humano y de cynomolgus

Para confirmar los niveles de expresión comparables del BCMA de cynomolgus y humano marcado con FLAG en las células HEK293T transducidas, se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, #F3165). Una etiqueta intracelular FLAG se fusionó al extremo C-terminal del BCMA humano y de cynomolgus. Para la tinción intracelular,  $10^6$  células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído, se permeabilizaron con una solución al 1% de saponina en PBS, y se incubaron con el anticuerpo anti-FLAG M2 durante 30 min a 4°C. Las células se enjuagaron con PBS, se incubaron durante 30 min con un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con RPE (AbD Serotec, # 103001), se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 1 mL de PBS/5% FCS para su análisis por citometría de flujo.

**Ejemplo 1.2.2: Líneas celulares humanas de mieloma que expresan BCMA sobre su superficie**

Se evaluó mediante citometría de flujo la expresión del BCMA en cinco líneas celulares humanas de mieloma (NCI-H929, RPMI-8226, U266B1, L-363 y JLN-3). Las células NCI-H929 ((H929) ATCC® CRL-9068™) se cultivaron en 80-90% de RPMI 1640 con 10-20% de FCS inactivado con calor que podía contener 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 50 µM de mercaptoetanol. Las células RPMI-8226 ((RPMI) ATCC® CCL-155™) se cultivaron en un medio que contenía 90% RPMI 1640 y 10% de FCS inactivado con calor. Las células U266B1 ((U266) ATCC® TIB-196™) se cultivaron en medio RPMI-1640 modificado para contener 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio, 4.500 mg/L de glucosa, y 1.500 mg/L de bicarbonato de sodio 15% de FCS inactivado con calor. La línea celular L-363 (Instituto DSMZ de Leibniz – Colección de microorganismos y cultivos celulares de Alemania; DSMZ No. ACC 49) se cultivó en 85% de RPMI 1640 y 15% de FCS inactivado con calor. La línea celular JLN-3 (DSMZ No. ACC 541) se cultivó en 40% de medio Dulbecco MEM + 40% de medio MDM de Iscove + 20% de FBS inactivado con calor. Brevemente, las células se cosecharon, lavaron, contaron para determinar su viabilidad, y se resuspendieron 50.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondo e incubaron con 10 µg/ml del anticuerpo anti-BCMA humano (Abcam, #ab54834, IgG1 de ratón) durante 30 min a 4°C (para prevenir la internalización). Una IgG1 de ratón se usó como control de isotipo (BD Biosciences, #554121). Las células luego se centrifugaron (5 min a 350 x g), se lavaron dos veces y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC durante 30 min a 4°C. Al finalizar el período de incubación, las células se centrifugaron (5 min a 350 x g), se lavaron dos veces con el buffer FACS, se resuspendieron en 100 µl de buffer FACS y se analizaron en un citómetro de flujo Cantoll corriendo el programa FACS Diva software. La cuantificación relativa del número de receptores BCMA sobre la superficie de la membrana de las líneas celulares de mieloma H929, RPMI-8226 y U266B1 se determinó mediante el análisis con el QIFIKIT (Dako, #K0078, siguiendo las instrucciones del fabricante). Las células H929 fueron las que expresaron el BCMA humano con la mayor densidad, hasta 5-6 veces mayor que las otras líneas celulares de mieloma. La línea celular H929 es considerada una línea celular de mieloma con alta expresión del BCMA en comparación con las células de mieloma RPMI-8226, U266 y L363 que son de baja expresión del BCMA. Las Tablas 4 y 4A resumen el número relativo de receptores BCMA sobre la superficie de las líneas celulares humanas de mieloma múltiple.

**Tabla 4:** Cuantificación del número de receptores BCMA sobre la superficie de la membrana de las líneas celulares de mieloma NCI-H929, RPMI-8226 y U266B1

Líneas celulares de mieloma	Sitios de unión relativos por célula
-----------------------------	--------------------------------------

H929	24.981
RPMI-8226	3.617
U266(B1)	4.794

**Tabla 4A:** Cuantificación del número de receptores BCMA sobre la superficie de las líneas celulares humanas de mieloma H929, L363, RPMI-8226, U266B1 y JLN-3

Líneas celulares humanas de mieloma	Capacidad de unión al antígeno específico (SABC)				
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5
H929	19.357	54.981	44.800	100.353	98.050
L363	16.970	/	11.300	11.228	/
U266(B1)	/	12.852	11.757	/	9.030
RPMI-8226	1.165	5.461	/	11.361	2.072
JLN-3	/	/	/	/	650

**5 Ejemplo 1.3: Obtención de los aglutinantes del BCMA de una librería recombinante in vitro Ejemplo 1.3.1: Construcción de las librerías Fab genéricas**

Se construyeron librerías genéricas de anticuerpos en el formato Fab en base a los genes humanos de la línea germinal usando las siguientes parejas de dominios V: cadena liviana kappa Vk3\_20 con cadena pesada VH3\_23 para la librería DP47-3 y la cadena liviana kappa Vk1\_17 con la cadena pesada VH1\_69 para la librería DP88-3. Ambas librerías se randomizaron en la CDR3 de la cadena liviana (L3) y en la CDR3 de la cadena pesada (H3) y se ensamblaron a partir de 3 fragmentos por librería mediante la PCR de empalme por extensiones de solapamiento (SOE). El fragmento 1 comprende la región 5´terminal del gen del anticuerpo que incluye la L3 randomizada, el fragmento 2 es un fragmento constante central que abraza de la L3 a la H3, mientras que el fragmento 3 comprende el H3 randomizado y la porción 3´del gen del anticuerpo. Las siguientes combinaciones de primers se usaron para generar los fragmentos de la librería para la librería DP47-3: fragmento 1 (LMB3-LibL1b\_nuevo), fragmento 2 (MS63-MS64), fragmento 3 (Lib2H-fdseqlong). Ver Tabla 1 de WO2012020038. Las siguientes combinaciones de primers se usaron para generar los fragmentos de la librería para la librería DP88-3: fragmento 1 (LMB3-RJH\_LIB3), fragmento 2 (RJH31-RJH32) y fragmento 3 (LIB88\_2-fdseqlong). Ver Tablas 3 y 4 de WO2012020038.

El protocolo de la PCR para la producción de los fragmentos de la librería incluye: 5 min de una desnaturalización inicial a 94°C; 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, y 1 min a 72°C; y una elongación final de 10 min a 72°C. Para la PCR de ensamblado, relaciones equimolares de los 3 fragmentos se usaron como templados. El protocolo de la PCR de ensamble incluye: 3 min de desnaturalización inicial a 94°C; y 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 min a

58° C, y 2 min a 72°C. En este estadio, se añadieron los primers complementarios a la secuencia por fuera de los fragmentos 1-3 y se llevaron a cabo 20 ciclos adicionales seguidos de una elongación final de 10 min a 72°C. Después de ensamblar cantidades suficientes de las construcciones al azar del Fab entero, las construcciones del Fab se digirieron con NcoI/NotI para la librería DP47-3 y con NcoI/NheI para la librería DP88-3 junto con el vector fagémido aceptor tratado de manera similar. Para la librería DP47-3, 22,8 µg de la librería Fab se ligó con 16,2 µg del vector fagémido. Para la librería DP88-3, 30,6 µg de la librería Fab se ligó con 30,6 µg del vector fagémido.

Las ligaciones purificadas se usaron para 68 transformaciones para la librería DP47-3 y 64 transformaciones para la librería DP88-3, respectivamente, para obtener las librerías DP47-3 y DP88-3 finales. Las partículas fagémidas que presentan las librerías Fab se rescataron y purificaron mediante la purificación con PEG/NaCl para ser usadas para la selección de los clones de Fab anti-BCMA.

**Ejemplo 1.3.2: Selección de los clones Fab anti-BCMA**

Se establecieron los Fabs anti-BCMA mediante la tecnología de phage display a partir de librerías sintéticas de Fab que consistían en las parejas de VL y VH derivadas de las diferentes familias de dominio V. Los clones 17A5 y 83A10 se generaron de la sublibrería Vk3\_20 / VH3\_23 y el clon 13A4 de la sublibrería Vk2D\_28 / VH5\_1, respectivamente (Tabla 5). Estas librerías se basan en las regiones framework (armazón) humanas enteras con una diversidad en la secuencia de la CDR3 de los dominios VL (3 longitudes distintas) y VH (6 longitudes distintas).

**Tabla 5:** Clones anti-BCMA y los respectivos apareamientos VL / VH

Clon Fab	Dominio VL	Dominio VH
17A5	Vk3_20	VH3_23
83A10	Vk3_20	VH3_23
13A4	Vk2D_28	VH5_1

Se llevaron a cabo las rondas de selección (biopaneos) en solución de acuerdo con el siguiente patrón: 1) pre-aclaramiento de ~ 10<sup>12</sup> partículas fagémidas por librería en inmunotubos sensibilizados con 10µg/ml de una IgG humana no relacionada para depletar las librerías de anticuerpos que reconocen la porción Fc de los antígenos; 2) incubación de las partículas fagémidas que no se unen a Fc con 100nM de BCMA biotinilado durante 0,5 h en presencia de 100nM de una construcción de Fc botón en ojal no biotinilado y no relacionada para una depleción adicional de las que se unen a Fc en un volumen total de 2 ml; 3) captura del BCMA biotinilado y unión específica del fago mediante la separación y la transferencia de la reacción de paneo en 16 pocillos de una placa de microtitulación pre-sensibilizada con neutravidina o estreptavidina durante 20 min en un agitador; 4) lavado de los respectivos pocillos 10-30x con PBS/Tween20 y 10-30x con PBS usando un lavador de microplacas; 5) paso opcional de lavado competitivo mediante la adición de 230nM de APRIL murina para desplazar a los clones Fab que reconocen el sitio de unión del ligando natural para así seleccionar los anticuerpos del fago que no compiten con APRIL; 6) elución de las partículas del fago mediante la adición de 125µl de 100mM de TEA (trietilamina) por pocillo durante 5-10 min y neutralización mediante la adición de un volumen igual de 1M de Tris/HCl pH 7,4; 7) re-infección de las células E. coli TG1 en fase log con las partículas eluidas del fago, infección con el fago colaborador VCSM13, incubación en un agitador a 30°C overnight y precipitación subsiguiente de las partículas fagémidas con PEG/NaCl para ser utilizadas en la próxima ronda de selección.

Las selecciones se llevaron a cabo en 3 a 5 rondas usando concentraciones constantes de antígeno de 100nM. Aparte de las campañas de selección durante las cuales el BCMA humano fue utilizado como antígenos, se llevaron

5 a cabo campañas adicionales de selección durante las cuales también se utilizaron BCMA de cynomolgus o murino, de una manera alternativa con el BCMA humano para seleccionar los anticuerpos que tengan reactividad cruzada. Además, como alternativa a la captura en base a placas de estreptavidina, la captura de los complejos antígeno : fago se realizó mediante la adición de  $5,4 \times 10^7$  perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina a la reacción de paneo seguido de pasos de lavado usando imanes bajo las condiciones descritas más arriba.

10 Los que se unen de manera específica se identificaron mediante tamizaje por resonancia plasmática de superficie de los sobrenadantes de cultivo bacteriano que contienen Fab usando el biosensor BioRad's ProteOn XPR36. En breve, después de la infección de las células de E. coli TG1 en fase log con las partículas de fago eluidas, una sola unidad formadora de colonia (cfu) se plaqueó y recogió para la inoculación en 1 ml de cultivo de expresión en placas de 96 pocillos profundos. Los Fabs se capturaron de los sobrenadantes en un chip ProteOn GLM que fue derivatizado con 8.000 – 10.000 RU de un anticuerpo policlonal específico de cabra anti-fragmento F(ab')<sub>2</sub> de IgG humana (Jackson ImmunoResearch, # 109-005-006) en una orientación vertical. Subsiguientemente, BCMA de cynomolgus y murino como así también una construcción de Fc botón en ojal no relacionada se inyectaron como analitos en una orientación horizontal. Los clones que exhibieron una unión significativa a BCMA y no se unieron a la porción Fc de los antígenos fueron expresados en bacterias en un cultivo de 0,5 litros, purificados por afinidad y caracterizados cinéticamente mediante un análisis de SPR usando el protocolo de cinética "one-shot" sobre el biosensor BioRad's ProteOn XPR36.

**Ejemplo 2: Ensayos de unión al BCMA: resonancia plasmática de superficie**

20 a) Se midió la afinidad (KD) de los distintos clones Fab anti-BCMA mediante resonancia plasmática de superficie usando un equipo ProteOn XPR36 (Biorad) a 25°C con BCMA biotinilada humana, de cynomolgus y murina inmovilizada en chips NLC mediante la captura con neutravidina (Tabla 6). Como control negativo, se inmovilizó de la misma manera una construcción no relacionada de Fc botón en ojal. Inmovilización de los antígenos (ligandos): los antígenos recombinantes se diluyeron con PBST (10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio pH 7,4, 0,005% de Tween 20) a 10 µg/ml, luego se inyectaron a 40 µl/minuto por 300s en una orientación vertical. Inyección de los analitos: Para hacer mediciones one-shot de cinética, la dirección de la inyección se cambió a una orientación horizontal, y se inyectaron simultáneamente una serie de diluciones al medio de Fab purificado (varios rangos de concentración) a 40µl/min a lo largo de los canales 1-5, con tiempos de asociación de 200 o 300s, y tiempos de disociación de 300s. El buffer (PBST) se inyectó a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco de referencia "en línea". Las constantes de velocidad de asociación (kon) y las constantes de velocidad de disociación (koff) se calcularon usando un modelo de unión simple uno-a-uno de Langmuir con el programa ProteOn Manager v3.1 software mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (KD) se calculó como la relación koff/kon. La regeneración se llevó a cabo en una orientación horizontal usando 10mM de glicine-HCl pH 1,5 a una velocidad de flujo de 100 µl/min para un tiempo de contacto de 18s.

35 **Tabla 6:** Afinidades monovalentes de los clones Fab anti-BCMA

Clon Fab	K <sub>D</sub> BCMA humano [nM]	KD BCMA cynomolgus [nM]	KD BCMA murino [nM]
17A5	45	-	74
83A10	76	1.510	1.130
13A4	1,8	-	-

- c) Evaluación de la unión de los anticuerpos anti-BCMA al BCMA recombinante mediante resonancia plasmática de superficie (SPR) como se detalla a continuación. Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como buffer de corrida (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de Surfactante P20, Biacore, Freiburg/Alemania). Se determinó la avidéz de la interacción entre los anticuerpos anti-BCMA y el BCMA Fc (kih) recombinante (humano, de cynomolgus y murino). El BCMA Fc(kih) recombinante humano, de cynomolgus y murino biotinilado se acopló directamente a un chip SA siguiendo las instrucciones (Biacore, Freiburg/Alemania). El nivel de inmovilización estaba en el rango de 200 a 700 RU. Los anticuerpos anti-BCMA se pasaron en un rango de concentración al medio (1,95 a 500 nM) con un flujo de 30 µL/minuto a través de las celdas de flujo por más de 120 segundos. La disociación se monitoreó por 180 segundos. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción al restar la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Aquí, los anticuerpos anti-BCMA se trasladaron sobre una superficie vacía previamente activada y desactivada como está descrito en el equipo comercial de acoplamiento estándar de aminas. Las constantes cinéticas aparentes se derivaron usando el programa Biacore T200 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión 1:1 de Langmuir mediante la integración numérica, a pesar de la bivalencia de la interacción con fines comparativos.
- d) También se determinó la afinidad de la interacción entre los anticuerpos anti-BCMA y el BCMA Fc(kih) recombinante humano. El anticuerpo anti-Fab humano (GE Healthcare) se acopló directamente sobre un chip CM5 a pH 5,0 usando el equipo comercial de acoplamiento de aminas estándar (Biacore, Freiburg/Alemania). El nivel de inmovilización fue aproximadamente 6.500 RU. El anticuerpo anti-BCMA se capturó durante 90 segundos a 25 nM. El BCMA Fc(kih) recombinante humano se pasó en un rango de concentración al cuarto (1.95 a 500 nM) con un flujo de 30 µL/minuto a través de las celdas de flujo por más de 120 segundos. La disociación se monitoreó por 120 segundos. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción al restar la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia. Aquí, el BCMA recombinante se trasladó sobre una superficie que contenía al anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado pero sobre el cual se inyectó HBS-EP en lugar del anticuerpo anti-BCMA. Las constantes cinéticas se derivaron usando el programa Biacore T200 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Uppsala/Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión 1:1 de Langmuir mediante la integración numérica (Tabla 7). También se midió la unión del anticuerpo anti-BCMA 83A10 al BCMA Fc(kih) recombinante de cynomolgus y al BCMA Fc(kih) recombinante murino (Tabla 8).

**Tabla 7.** Constantes de afinidad determinadas mediante el ajuste de las ecuaciones de velocidad para la unión 1:1 de Langmuir

Ligando	Analito	Kon[1/Ms]	Koff[1/s]	KD[M]
IgG anti-BCMA 17A5	huBCMA Fc(kih)	2,2x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>-3</sup>	8,7x10 <sup>-9</sup>
IgG anti-BCMA 83A10	huBCMA Fc(kih)	6,2x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	4,1x10 <sup>-9</sup>
IgG anti-BCMA 13A4	huBCMA Fc(kih)	7,2x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>-4</sup>	5,1x10 <sup>-9</sup>

**Tabla 8:** Unión del Fc BCMA recombinante (kih) al anticuerpo anti-BCMA 83A10: Fc BCMA humano (kih); Fc BCMA de cynomolgus (kih); Fc BCMA murino (kih)

Ligando	Analito	Kon[1/Ms]	Koff[1/s]	KD[M]
IgG anti-BCMA 83A10	huBCMA Fc(kih)	6,2x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	4,1x10 <sup>-9</sup>



IgG anti-BCMA 83A10	cyBCMA Fc(kih)	$2,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-2}$	$7,2 \times 10^{-8}$
IgG anti-BCMA 83A10	muBCMA Fc(kih)	$2,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-7}$

### Ejemplo 3: Ensayo de especificidad de los anticuerpos IgG anti-BCMA huTACI-R y huBAFF-R

Como miembros de la superfamilia de TNF-TNF-R, los receptores TACI y BAFF están relacionados con el receptor BCMA con una homología respectivamente del 22% y 18.5% en el dominio extracelular. Por consiguiente, se realizaron experimentos de unión mediante resonancia plasmática de superficie (SPR) para examinar la especificidad de los anticuerpos IgG anti-BCMA. Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un Biacore T200 (GE Healthcare) a 25 °C con HBS-EP con buffer de corrida (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de Surfactante P20). Los huBCMA, huBAFF-R y huTACI-R fusionados a Fc se inmovilizaron químicamente con un alto nivel de inmovilización (~5000 RU) en los diferentes canales de flujo de un chip sensor Biacore CM5 a pH 5.0 usando un equipo comercial de acoplamiento de aminas estándar (GE Healthcare). Inicialmente, se inyectaron soluciones con alta concentración (1.5µM, disueltas en HBS-EP) de IgG anti-BCMA 83A10 como así también de IgG a-huTACI-R e IgG a-huBAFF-R como controles positivos (tiempo de asociación: 80s, tiempo de disociación: 600s, flujo: 30µl/min) para chequear si se produce la unión. Un evento de unión positivo de la IgG a-huTACI-R IgG al huTACI-R como así también de la IgG a-huBAFF-R al huBAFF-R y los anticuerpos IgG anti-BCMA al huBCMA indica que todos los receptores son todavía reconocidos luego de la inmovilización. Para la unión de los anticuerpos IgG anti-BCMA con constantes de velocidad cinética rápida al huBAFF-R y/o huTACI-R, se realizó una examinación cuidadosa de los parámetros cinéticos con bajos niveles de inmovilización (300 RU) en un nuevo chip sensor CM5. Las diluciones de anticuerpos IgG anti-BCMA IgG a concentraciones de 700; 350; 175; 87,5; 43,75; 21,88 nM (disueltos en HBS-EP) se inyectaron (tiempo de asociación: 80s, tiempo de disociación: 300s, flujo: 30µl/min), y la(s) muestra(s) se ensayaron por duplicado. Cuando fuera aplicable, se realizó la regeneración, es decir una disociación no rápida y completa. Se llevó a cabo la evaluación cinética de la interacción entre los anticuerpos IgG anti-BCMA y huBAFF-R o huTACI-R mediante el ajuste global de los datos en un modelo de interacción 1:1 que incluye un término para el transporte de masa (Biacore evaluation Version 2.0). También se llevó a cabo un análisis en estado estacionario con las concentraciones más altas de los anticuerpos IgG anti-BCMA.

### Ejemplo 4: Unión de los anticuerpos BCMA a las líneas celulares de mieloma múltiple BCMA-positivas (Citometría de flujo)

Se analizó por citometría de flujo la capacidad de los anticuerpos IgG anti-BCMA (clones 17A5, 83A10, 13A4) de unirse al BCMA humano en las células H929 que expresan BCMA. Las células MKN45 (línea celular humana de adenocarcinoma gástrico que no expresa BCMA) se usaron como control negativo. Brevemente, las células cultivadas fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100 µl por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30 µl de los anticuerpos anti-BCMA o de los correspondientes anticuerpos control de IgG durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos anti-BCMA (y el control de isotipo) se titularon y analizaron en un rango de concentración final entre 0,1-40 µg/ml. Luego, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120 µl/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4°C con el fragmento de cabra F(ab')<sub>2</sub> anti-el fragmento específico Fc de IgG humana conjugado con el fluorocromo PE y purificado por afinidad (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Luego las células se lavaron dos veces con el buffer de tinción (BD Biosciences), se fijaron usando 100 µl por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 120 µl de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Cantoll. La Figura 4, muestra intensidad media de fluorescencia de los clones de los anticuerpos IgG anti-BCMA graficada en función de la concentración de anticuerpo BCMA; (A) clones 17A5, 83A10 en células H929, (B) clones 17A5, 83A10 en células MKN45, (C) clon 13A4 en células H929, (D) clon 13A4 en células MKN45. Los valores de EC<sub>50</sub> (que denotan la concentración de anticuerpo requerida para alcanzar el 50% de la máxima unión) de la unión de los clones 17A5, 83A10 a las células H929 se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 9:** Valores de EC50 de la unión de los anticuerpos anti-BCMA a las células de mieloma múltiple H929

	Anticuerpo anti-BCMA clon 83A10	Anticuerpo anti-BCMA clon 17A5
EC50 (nM)	12,5	9,0
EC50 (µg/ml)	1,8	1,3

**Ejemplo 5:** 100 ng/mL, preferentemente 1.000 ng/mL de APRIL no altera la unión del anticuerpo BCMA al BCMA humano (Citometría de flujo y ELISA)

- 5 a) Identificación de los Fab o anticuerpos anti-BCMA que no compiten con APRIL por ELISA. Se evaluó la unión de los Fab al BCMA humano inmovilizado en presencia de concentraciones crecientes de APRIL murina. Se sensibilizó una placa de neutravidina con 25nM del BCMA humano biotilado (100µl/pocillo) y se incubó en un agitador durante 1h a temperatura ambiente. Se añadieron 500nM o 1000nM de Fab purificados para saturar al BCMA humano con el que se sensibilizó la placa durante 1h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBS y se añadió APRIL murina a ocho concentraciones diferentes usando una serie de diluciones al medio en buffer PBS, en el rango de 0 a 100nM, y se incubó en un agitador durante 30 min. La placa se lavó 3 veces con PBS y se añadió el anticuerpo secundario anti-FLAG-HRP (1:4.000) durante 1h. Nuevamente, la placa se lavó 3 veces con PBS y se reveló al añadir 100µl/pocillo de BM Blue POD (Roche). La reacción se frenó al añadir 50µl/pocillo de 1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la DO se leyó a 450nm (referencia a 650nm) para una lectura final de DO<sub>450-650</sub>. Los resultados de los Fab seleccionados se muestran en la Figura 5. La disminución (%) en los valores de DO medidos con los clones anti-BCMA en ausencia vs en presencia de 50 nM (1.200 ng/mL) o 6,25 nM (140 ng/mL) de muAPRIL (Δ-APRIL murina) se resume en la Tabla 10.

**Tabla 10:** Disminución en los valores de DO medidos (450 nm) en ausencia vs. presencia de Δ-APRIL murina

ΔAPRIL (nM y ng/mL)	Anticuerpos anti-BCMA		
	17A5	83A10	13A4
50 nM / 1.200 ng/mL	↓34,5%	↓6,3%	↓13,1%
6,25 nM / 140 ng/mL	↓5,6%	no ↓	↓7,7%

- 20 a) b) Competencia de Δ-APRIL con los anticuerpos anti-BCMA detectada por citometría de flujo. La evaluación de la eventual competencia entre Δ-APRIL y los anticuerpos anti-BCMA se llevó a cabo en las células H929 mediante la cuantificación de la unión de Δ-APRIL en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos anti-BCMA (clones 17A5, 83A10, 13A4). Brevemente, las células cultivadas fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicotaron 100 µl por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30 µl de los anticuerpos anti-BCMA o del correspondiente control de IgG durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos anti-BCMA (y el control de isotipo) se titularon y analizaron en un rango de concentración final de 1, 16 y 40 µg/ml. Luego, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con

120 µl/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4°C con 1 µg/ml de Δ-APRIL recombinante de ratón marcada con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010). Luego las células se lavaron una vez con 120 µl/pocillo de buffer FACS y se incubaron con un anticuerpo anti-HA conjugado con FITC (Sigma Aldrich, #H7411) durante 30 min a 4°C. Al finalizar el período de incubación, las células se lavaron con 120 µl/pocillo de buffer FACS, se fijaron usando 100 µl por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 80 µl de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Fortessa. La Figura 6 muestra la intensidad media de fluorescencia relativa de Δ-APRIL (señal de FITC) detectada en función de las concentraciones crecientes de los clones 13A4 del anticuerpo anti-BCMA sobre las células H929. La intensidad media de fluorescencia tras la unión de Δ-APRIL en presencia del control de isotipo se estableció como uno; las otras señales se relativizaron con este valor.

b) c) Competencia de los anticuerpos anti-BCMA con Δ-APRIL detectada por citometría de flujo. La evaluación de la eventual competencia entre Δ-APRIL y los anticuerpos anti-BCMA se llevó a cabo en las células RPMI mediante la cuantificación de la unión de los anticuerpos anti-BCMA (clones 13A4, 17A5, 83A10) en presencia o ausencia de Δ-APRIL. Brevemente, las células cultivadas fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100 µl por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30 µl de los anticuerpos anti-BCMA o del correspondiente control de IgG durante 20 min a 4°C. Todos los anticuerpos anti-BCMA y el control de isotipo se analizaron a una concentración final de 40 µg/ml. Luego, la células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120 µl/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 40 min adicionales a 4°C con 1 µg/ml de Δ-APRIL recombinante de ratón marcada con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010). Luego las células se lavaron una vez con 120 µl/pocillo de buffer FACS y se incubaron con un anticuerpo anti-Fc humana conjugado con Alexa.Fluor 647 (Jackson Immuno Research Lab, #109-606-008) durante 30 min a 4°C. Al finalizar el período de incubación, las células se lavaron con 120 µl/pocillo de buffer FACS, se fijaron usando 100 µl por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 80 µl de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Fortessa. La Figura 7 muestra la intensidad media de fluorescencia relativa del anticuerpo anti-BCMA (señal de Alexa.Fluor 647) de los clones 13A4, 17A5, 83A10 sobre las células RPMI detectada en ausencia o presencia de 1.000 ng/mL de Δ-APRIL. La intensidad media de fluorescencia tras la unión de los anticuerpos anti-BCMA en ausencia de Δ-APRIL se estableció como uno; las otras señales respectivamente al anticuerpo anti-BCMA en presencia de Δ-APRIL se relativizaron con este valor.

c) d) Competencia de los anticuerpos anti-BCMA con Δ-APRIL luego de incubarlos simultáneamente detectada por citometría de flujo. La evaluación de la eventual competencia entre Δ-APRIL y los anticuerpos anti-BCMA se llevó a cabo en las células H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) mediante la cuantificación de la unión de los anticuerpos anti-BCMA (clones 17A5, 83A10, 13A4) en presencia o ausencia de Δ-APRIL. Brevemente, las células cultivadas fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100 µl por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30 µl de los anticuerpos anti-BCMA o del correspondiente control de IgG y de 30 µl de Δ-APRIL marcada con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010) durante 40 min a 4°C. Todos los anticuerpos anti-BCMA y el control de isotipo se analizaron a una concentración final de 20 µg/ml; Δ-APRIL a una concentración final de 2,5 µg/ml. Luego, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120 µl/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences). Después de ello, las células se incubaron durante 30 min a 4°C con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa.Fluor 647 (Jackson Immuno Research Lab, #109-606-008) y con un anticuerpo anti-HA conjugado con FITC (Sigma Aldrich, #H7411). Al finalizar el período de incubación, las células se lavaron con 120 µl/pocillo de buffer FACS, se fijaron usando 100 µl por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 80 µl de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Cantoll. La Figura 8A muestra la intensidad media de fluorescencia y la señal de fluorescencia relativa del clon del anticuerpo anti-BCMA (señal de Alexa Fluor 647) y la Figura 8B muestra la intensidad media de fluorescencia y la señal de fluorescencia relativa de Δ-APRIL (señal de FITC) y del clon del anticuerpo anti-BCMA (señal de Alexa Fluor 647). La detección de Δ-APRIL en presencia del clon del anticuerpo anti-BCMA con el anticuerpo anti-HA conjugado con Alexa.Fluor 647 se normalizó con la señal de Δ-APRIL en presencia del control de isotipo. La disminución de la unión de los anticuerpos anti-BCMA (20 µg/mL) clones 13A4, 17A5 y 83A10 en presencia de Δ-APRIL (2,5 µg/mL) detectada con el anticuerpo anti-Fc humano conjugado con FITC se resume en la Tabla 11.

55

**Tabla 11:** Disminución de la unión de los anticuerpos anti-BCMA a las células H929 en presencia de APRIL

Clones de anticuerpos anti-BCMA	Disminución (↓) de la unión de los anticuerpos anti-BCMA en presencia de APRIL
13A4	25%
17A5	20%
83A10	10%

### Ejemplo 6: Los anticuerpos anti-BCMA no inducen solo la activación de NF-κB (ensayo de luminiscencia)

Se evaluó si la unión de los anticuerpos anti-BCMA a las células H929 que expresan BCMA induce la activación de NF-κB, una conocida vía de señalización corriente abajo del BCMA. Brevemente, a las células H929 se las cultivó en RPMI 1640 con 0,25% de FCS durante 24 h a 37°C en una estufa para células. Luego del período de incubación, las células se cosecharon, contaron y se evaluó la viabilidad celular usando el ViCell. Las células viables se ajustaron a  $4 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 30  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30  $\mu$ l de los anticuerpos anti-BCMA a una concentración de 100 o 350 nM (14 o 50  $\mu$ g/ml) durante 20 min a 37°C. Como control negativo, se usaron células sin tratar o células que se incubaron con los correspondientes anticuerpos control del isotipo IgG a 100 nM (14  $\mu$ g/ml) durante 20 min a 37°C. Como control positivo, se usaron células incubadas con 1  $\mu$ g/ml de la proteína recombinante de ratón  $\Delta$ -APRIL marcada con hemaglutinina (HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010) durante 20 min a 37°C. Al finalizar el período de incubación, las células se cosecharon, lavaron y procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante del equipo comercial Nuclear Extract Kit (Active Motif, # 40410). Se analizó la actividad de NF-κB en los extractos proteicos utilizando el equipo comercial TransAm® NF-κB p65 Chemi Assay kit (Active Motif, #40097) siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal de luminiscencia se leyó usando el luminómetro Spectra Max M5 (Molecular Devices). Como se muestra en la Figura 9, se alcanzó un aumento de 4,2 veces en la señal de luminiscencia cuando las células H929 fueron expuestas a 1  $\mu$ g/ml de APRIL en comparación con las células H929 solas. En las células H929 solas o en presencia de los anticuerpos control de isotipo se observó un background de señales de luminiscencia, el cual podría explicarse por la activación basal de NF-κB observada en las líneas celulares de mieloma múltiple, tal como fue descrito previamente (Demchenko et al., Blood 2010; 115 (17): 3541-3552). La adición de los anticuerpos anti-BCMA (17A5, 83A10) solos no indujo la activación adicional de NF-κB en comparación con el respectivo control de isotipo. Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-BCMA no inducen la activación de NF-κB tras la unión a las células BCMA-positivas.

### Ejemplo 7: Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3

#### Ejemplo 7.1: Anticuerpos anti-CD3

El término "CD3ε o CD3" tal como aquí se utiliza, se refiere al CD3ε humano descrito como UniProt P07766 (CD3E\_HUMAN). El término "anticuerpo contra CD3, anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo que se une al CD3ε. Preferentemente, el anticuerpo comprende a un dominio variable VH que comprende a las CDR de las cadenas pesadas de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas, y un dominio variable VL que comprende a las CDR de las cadenas livianas de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas livianas. Preferentemente el anticuerpo comprende a los dominios variables de SEQ ID NO:7 (VH) y SEQ ID NO:8 (VL).

El anticuerpo anti-CD3 que se describió arriba se utilizó para generar los anticuerpos biespecíficos de células T que son usados en los siguientes ejemplos.

**Ejemplo 7.2: Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 que contienen Fc en un formato 2+1**

5 Los ADNc que codifican para las cadenas pesadas y livianas de los correspondientes anticuerpos IgG1 anti-BCMA como así también los ADNc de VH y VL anti-CD3 se usaron como materiales de partida. Cada anticuerpo biespecífico, poseía cuatro cadenas proteicas que comprendían a las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo correspondiente anti-BCMA y las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo anti-CD3, según lo descrito más arriba. Con el fin de minimizar la formación de productos secundarios con cadenas pesadas mal apareadas, por ejemplo, con dos cadenas del anticuerpo anti-CD3, se usó una región Fc heterodimérica mutada que contiene "mutaciones botón en ojal" y un enlace disulfuro, según lo descrito en WO2009080251 y en WO2009080252. Con el fin de minimizar la formación de productos secundarios con cadenas livianas mal apareadas, por ejemplo, con dos cadenas livianas del anticuerpo anti-BCMA, se aplicó un entrecruzamiento entre una CH1 por una constante kappa a las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo anti-CD3 usando la metodología descrita en WO2009080251 y en WO2009080252.

15 a) Un anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un formato 2+1, es decir, anticuerpo biespecífico  $(Fab)_2 \times (Fab)$  que es bivalente para el BCMA y monovalente para el CD3 tendría ventajas en la potencia, predictibilidad para su eficacia y seguridad porque se uniría preferentemente al blanco tumoral BCMA y evitaría disipar al anticuerpo CD3, por lo cual se tendría una mayor probabilidad de que la droga se enfoque en el tumor.

20 Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 con un formato 2+1 (es decir, anticuerpos biespecíficos  $(Fab)_2 \times (Fab)$  bivalentes para el BCMA y monovalentes para el CD3 con Fc para el BCMA humano fueron producidos por los anticuerpos BCMA humanos previamente seleccionados. Los ADNc que codifican para los Fab (dominios VH y CH1 de la cadena pesada más los dominios VL y CL de la cadena liviana) de los correspondientes anticuerpos IgG1 anti-BCMA como así también los ADNc de VH y VL anti-CD3, se usaron como materiales de partida. Cada anticuerpo biespecífico, poseía cuatro cadenas proteicas que comprendían a las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo correspondiente anti-BCMA y las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo anti-CD3, descritos más arriba, respectivamente, con las regiones Fc.

30 Brevemente, cada anticuerpo biespecífico se produjo mediante la co-transfección simultánea de los vectores de expresión para células de mamíferos que codifican, respectivamente: a) el ADNc de la cadena liviana del correspondiente anticuerpo anti-BCMA, b) un ADNc fusionado generado mediante métodos de biología molecular estándar, tales como la PCR de empalme por extensiones de solapamiento que codifica para una proteína de fusión hecha de (en el orden N-terminal a C-terminal) una secuencia señal secretoria, Fab (VH seguido de los dominios CH1) del correspondiente anticuerpo anti-BCMA descrito más arriba, un linker flexible de glicina(Gly)-serina(Ser) con la secuencia Gly-Gly- Gly- Gly-Ser-Gly-Gly- Gly- Gly-Ser, Fab (VH seguido de los dominios CH1) del correspondiente anticuerpo anti-BCMA descrito más arriba, un linker flexible de glicina(Gly)-serina(Ser) con la secuencia Gly-Gly- Gly- Gly-Ser-Gly-Gly- Gly- Gly-Ser, el VH del anticuerpo anti-CD3 descrito más arriba y el dominio constante kappa de una cadena liviana codificada por el ADNc, c) un ADNc fusionado generado mediante métodos de biología molecular estándar, tales como a PCR de empalme por extensiones de solapamiento que codifica para una proteína de fusión hecha de (en el orden N-terminal a C-terminal) una secuencia señal secretoria, VL del anticuerpo anti-CD3 descrito más arriba, dominio constante CH1 de la IgG1 humana codificada por el ADNc. Se realizó la co-transfección en células de mamíferos y la producción y purificación de los anticuerpos usando los métodos descritos anteriormente para la producción de los anticuerpos IgG1 humanos o humanizados, con una modificación: para la purificación de los anticuerpos, el primer paso de captura no se realiza usando la Proteína A, sino que se usa una columna de cromatografía de afinidad empaquetada con una resina que se une a la región constante de la cadena liviana kappa humana, como la KappaSelect (GE Healthcare Life Sciences). Además, se pueden incluir un puente disulfuro para incrementar la estabilidad y los rendimientos como así también residuos adicionales que formen puentes iónicos e incrementen los rendimientos de la heterodimerización (EP 1870459A1).

50 b) Para la generación de vectores del anticuerpo biespecífico BCMAxCD3, las moléculas biespecíficas derivadas de IgG1 consisten al menos de dos motivos de unión al antígeno capaces de unirse específicamente a dos determinantes antigénicos distintos CD3 y BCMA. Los motivos de unión al antígeno eran los fragmentos Fab compuestos por una cadena pesada y una liviana, cada una comprendiendo a su vez una región variable y una constante. Al menos uno de los fragmentos Fab era un fragmento "Fab entrecruzado", en donde los dominios Fab de la cadena pesada y la liviana se intercambiaron. El intercambio de los dominios constantes de la cadena pesada y liviana dentro del fragmento Fab garantiza que los fragmentos Fab de diferente especificidad no tengan

reordenamientos idénticos en sus dominios y consiguientemente, no intercambien las cadenas livianas. El diseño de la molécula biespecífica fue monovalente para el CD3 y bivalente para el BCMA, donde el fragmente Fab fue fusionado al extremo N-terminal del Fab entrecruzado (2+1) interno. La molécula biespecífica contenía una porción Fc para tener una vida media más prolongada. Una representación esquemática de las construcciones se muestra en las Figuras 2; las secuencias de las construcciones preferidas se muestran en SEQ ID NOs 41, y 43 a 52. Las moléculas se lograron producir mediante la con-transfección de las células HEK293-EBNA que crecen en suspensión con los vectores de expresión para células de mamíferos usando una transfección a base de polímeros. Para la preparación de las construcciones IgG1-Fab entrecruzado 2+1, las células se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión ("vector del Fc(botón)" : "vector de la cadena liviana" : "vector del Fab entrecruzado de la cadena liviana" : "vector del Fab entrecruzado de la cadena pesada") en una relación 1:2:1:1.

### Ejemplo 7.3: Generación de anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 para comparación

La generación de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 que bloquean APRIL y BAFF, J6M0-TCBcv y BCMA50-sc(Fv)<sub>2</sub> (también conocidos como BCMA50-BiTE®) y las secuencias de aminoácidos se usaron de acuerdo con WO2012163805 y WO2013072406/WO2013072415, respectivamente.

### 15 Ejemplo 8: Producción y purificación de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 que contienen Fc (2+1) con o sin las variantes de carga

Para la producción de los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos biespecíficos se expresaron mediante la co-transfección transitoria de los respectivos vectores de expresión para células de mamíferos en las células HEK293-EBNA, que se cultivaron en suspensión, utilizando un método de transfección a base de polímeros. Un día antes de la transfección, se sembraron 1,5 millones de células HEK293-EBNA viables/mL en el medio Ex-Cell, suplementado con 6 mM de L-Glutamina. Por cada mL del volumen final de producción, se centrifugaron 2,0 millones de células viables (5 minutos a 210 x g). Se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µL de medio CD CHO. Por cada mL del volumen de producción final, el ADN se preparó al mezclar 1 µg de ADN (Relación cadena pesada: cadena pesada modificada: cadena liviana: cadena liviana modificada = 1:1:2:1) en 100 µL de medio CD CHO. Después de adicionar 0,27 µL de la solución a base de polímeros (1 mg/mL), la mezcla se vortexeó durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego de los 10 minutos, se juntaron las células resuspendidas y la mezcla que contiene la solución a base de polímeros/ADN y luego se transfirieron a un recipiente adecuado y se colocaron en un agitador (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Después de un período de incubación de 3 horas, 800 µL del medio Ex-Cell, suplementado con 6 mM L-Glutamina, 1,25 mM de ácido valproico y 12,5% de Pepsoy (50 g/L), se añadieron por cada ml del volumen final de producción. Luego de 24 horas, 70 µL de una solución de alimentación se añadió por cada ml del volumen final de producción. Después de 7 días o cuando la viabilidad celular fue igual o menor al 70%, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación y se esterilizaron por filtración. Los anticuerpos se purificaron mediante un paso de afinidad y uno o dos pasos de pulido, mediante cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión molecular. Cuando fue necesario, se usaron más pasos de pulido.

Para la etapa de afinidad, el sobrenadante se sembró en una columna de proteína A (HiTrap Proteína A FF, 5 mL, GE Healthcare) equilibrada con 6 CV 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrato de sodio, pH 7,5. Después de la etapa de lavado con el mismo buffer, el anticuerpo se eluyó de la columna en la etapa de elución con 20 mM de fosfato de sodio, 100 mM de cloruro de sodio, 100 mM de Glicina, pH 3,0. Las fracciones con el anticuerpo deseado se neutralizaron inmediatamente con 0,5 M de fosfato de sodio, pH 8,0 (1:10), se juntaron y concentraron por centrifugación. El concentrado se esterilizó por filtración y se procesó por cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de exclusión molecular.

Para la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, la proteína concentrada se diluyó 1:10 con el buffer de elución usado en la etapa de afinidad y se sembró en una columna de intercambio catiónico (Poros 50 HS, Applied Biosystems). Después de dos pasos de lavado con el buffer para equilibrar y el buffer de lavado, respectivamente 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de TRIS, pH 5,0 y 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de TRIS, 100 mM de cloruro de sodio pH 5,0 la proteína se eluyó en un gradiente con 20 mM de fosfato de sodio, 20 mM de citrate de sodio, 20 mM de TRIS, 100 mM de cloruro de sodio pH 8,5. Las fracciones que contenían al anticuerpo deseado se juntaron, concentraron por centrifugación, se esterilizaron por filtración y se procesaron por cromatografía de exclusión molecular.

Para la etapa de exclusión molecular, la proteína concentrada se inyectó en una columna XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), y 20 mM de Histidina, 140 mM de Cloruro de Sodio, pH 6,0 con o sin Tween20 como buffer de formulación. Las fracciones que contenían a los monómeros se juntaron, concentraron por centrifugación y se esterilizó por filtración en un vial estéril.

- 5 La determinación de la concentración del anticuerpo se realizó al medir la absorbancia a 280 nm, usando el valor teórico de absorbancia de una solución del anticuerpo al 0,1%. Este valor se basó en la secuencia de aminoácidos y se calculó con el programa GPMaw software (Lighthouse data).

- 10 La pureza y el contenido de monómeros de la preparación final se determinó mediante CE-SDS (Caliper LabChip GXII system (Caliper Life Sciences)) resp. HPLC (columna analítica de exclusión molecular TSKgel G3000 SW XL (Tosoh)) en un buffer con 25 mM de fosfato de potasio, 125 mM de cloruro de sodio, 200 mM de Monoclorhidrato de L-arginina, 0,02 % (w/v) de azida de sodio, pH 6,7.

- 15 Para verificar el peso molecular de las preparaciones proteicas finales y confirmar la preparación homogénea de las moléculas en la solución proteica final, se usó una cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS). Primero se llevó a cabo un paso de desglucosilación. Para remover la heterogeneidad introducida por los carbohidratos, las construcciones se trataron con PNGasaF (ProZyme). Para ello, se ajustó el pH de la solución proteica a pH 7,0 mediante la adición de 2 µl de 2 M de Tris a 20 µg de proteína con una concentración de 0,5 mg/ml. Se añadieron 0,8 µg de PNGasaF y se incubó durante 12 h a 37 °C. Luego se llevó a cabo la detección on-line con el LC-MS. El método LC-MS se realizó en un HPLC Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas TOF 6441 (Agilent). La separación cromatográfica se realizó en una columna de poliestireno Macherey Nagel; RP1000-8 (tamaño de partícula 8 µm, 4,6 x 250 mm; cat. No. 719510). El Eluyente A fue 5 % de acetonitrilo y 0,05 % (v/v) de ácido fórmico en agua, el eluyente B fue 95 % de acetonitrilo, 5 % de agua y 0,05 % de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue 1 ml/min, la separación se llevó a cabo a 40°C y 6 µg (15 µl) de una muestra de proteína obtenida con el tratamiento descrito anteriormente.
- 20

Tiempo (min.)	%B
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

- 25 Durante los primeros 4 minutos, el eluato directamente se desechó para proteger al espectrómetro de masas de la contaminación con sales. La fuente de ionización por electro spray (ESI) se estuvo corriendo con un flujo de gas de secado de 12 l/min, una temperatura de 350°C y una presión de nebulización de 60psi. Los espectros del MS se

adquirieron usando un voltaje de fragmentación de 380 V y un rango de masa de 700 a 3.200 m/z operando en modo ion positivo. Los datos del MS se adquirieron con el programa del equipo durante 4 a 17 minutos.

5 La Figura 10 muestra los gráficos de CE-SDS (no reducidos) de las preparaciones proteicas finales luego de los diferentes métodos de purificación de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv. Los pasos de purificación por  
 10 cromatografía de afinidad en proteína A (PA) y por cromatografía de exclusión molecular (SEC) aplicados al anticuerpo 83A10-TCB resultaron en una pureza <30% y un contenido de monómeros del 82,8% (A). Cuando se aplicaron pasos adicionales de purificación en los que se incluyeron la cromatografía de intercambio catiónico (cIEX) y un paso final de cromatografía de exclusión molecular (re-SEC) a la preparación proteica final obtenida en (A), la pureza aumentó a un 93,4% pero el contenido de monómeros permaneció igual y el rendimiento disminuyó  
 15 significativamente a 0,42 mg/L. Sin embargo, cuando se aplicaron modificaciones específicas en la carga al Fab CL-CH1 anti-BCMA 83A10, llamado anticuerpo 83A10-TCBcv, se observó un perfil de producción/purificación superior de la molécula TCB, tal como lo demuestra una pureza del 95,3%, un contenido de monómeros del 100% y un rendimiento de hasta 3,3 mg/L, aun habiéndose aplicado los pasos de purificación PA + cIEX + SEC (C) en comparación con (B) con un perfil de producción/purificación que muestra un rendimiento 7,9 veces más bajo y un contenido de monómeros 17,2% menor a pesar de la inclusión de un paso de purificación adicional re-SEC.

Un ciclo de producción cabeza-a-cabeza para comparar el perfil de producción/purificación de los anticuerpos 83A10-TCB vs. 83A10-TCBcv se llevó a cabo para evaluar las ventajas de las modificaciones en la carga de CL-CH1 aplicada a los anticuerpos. Las moléculas 83A10-TCB y 83A10-TCBcv están ambas en formato molecular como se describe en la Figura 2a. Como se muestra en la Figura 11, las propiedades de los anticuerpos 83A10-TCB  
 20 y 83A10-TCBcv se midieron juntas y se compararon después de cada etapa de purificación 1) solo cromatografía de afinidad en PA (A, B), 2) cromatografía de afinidad en PA, seguido de SEC (C, D) y 3) cromatografía de afinidad en PA, seguido de SEC, seguido de cIEX y re-SEC (E, F). Los gráficos de CE-SDS (no-reducidos) de las soluciones proteicas finales luego de los respectivos métodos de purificación de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv se muestran en la Figura 11. Como se observa en las Figuras 11A y 11B, las mejoras con la aplicación de las variantes de carga a los anticuerpos TCB se observaron después de la purificación con solamente la cromatografía de afinidad en PA. En este estudio cabeza-a-cabeza, el paso de purificación por cromatografía de afinidad en PA aplicado al anticuerpo 83A10-TCB resultó en una pureza del 61,3%, un rendimiento de 26,2 mg/L y un contenido de monómeros del 63,7% (11A). En comparación, cuando el anticuerpo 83A10-TCBcv se purificó por cromatografía de afinidad en PA, todas las propiedades se mejoraron, con un mejor nivel de pureza (81,0%), un mejor rendimiento (51,5 mg/L) y un contenido de monómeros mayor (68,2%) (11B). Cuando se aplicó a las preparaciones proteicas finales un paso adicional de purificación por SEC, tal como se observa en las Figuras 12A y 12B, el anticuerpo 83A10-TCB obtuvo una pureza del 69,5%, un rendimiento de 14,1 mg/L y un contenido de monómeros del 74,7% (C) en comparación con el anticuerpo 83A10-TCBcv que presentó una mejora en su pureza y en el contenido de monómeros de hasta un 91,0% y 83,9% respectivamente, y un rendimiento de 10,3 mg/L (D). A pesar de que el rendimiento fue ligeramente menor (es decir, 27% menor) para el anticuerpo 83A10-TCBcv en comparación con el anticuerpo 83A10-TCB en este experimento, el porcentaje de moléculas correctas fue mucho mejor para el anticuerpo 83A10-TCBcv que para el 83A10-TCB, respectivamente 90% vs. 40-60%, según lo medido por LC-MS. En la tercera comparación cabeza-a-cabeza, las preparaciones finales de las proteínas de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv de las Figuras 11C y 11D se juntaron con aproximadamente 1 L (volumen equitativo) de las respectivas preparaciones de proteína finales de otro lote de purificación (misma producción) seguido por solamente un paso de purificación por cromatografía de afinidad en PA. Las preparaciones de proteína se juntaron y luego se purificaron adicionalmente por los métodos de purificación cIEX y SEC. Como se muestra en las Figuras 11E y 11F, se observó consistentemente una mejora en el perfil de producción/purificación del anticuerpo TCB con las variantes de carga cuando se comparó con el anticuerpo TCB sin la variante de carga. Luego de que varios pasos de purificación (es decir, PA +/- SEC + cIEX + SEC) se usaran para purificar al anticuerpo 83A10-TCB, solamente se alcanzó una pureza del 43,1% y un contenido de monómeros del 98,3%, pero en detrimento del rendimiento, el cual se redujo a 0,43 mg/L. El porcentaje de moléculas correctas medido por LC-MS fue todavía pobre, con un 60-70%. Al terminar, la calidad de la preparación proteica final fue no aceptable para su uso in vitro. En cambio, cuando los mismos pasos de purificación realizados con la misma cronología se aplicaron al anticuerpo 83A10-TCBcv, se alcanzó una pureza del 96,2% un contenido de monómeros del 98,9% y un porcentaje de moléculas correctas por LC-MS del 95%. Sin embargo, el rendimiento se redujo considerablemente a 0,64 mg/L luego del paso de purificación por cIEX. Los resultados muestran que una mejor pureza, un mayor contenido de monómeros, un mayor porcentaje de moléculas correctas y un mejor rendimiento se pueden lograr con el anticuerpo 83A10-TCBcv después de solamente dos pasos de purificación estándar, es decir, cromatografía de afinidad en PA y SEC (Figura 11D) mientras que tales propiedades no pudieron lograrse con el anticuerpo 83A10-TCB aún cuando se aplicaron pasos de purificación adicionales (Figura 11E).



5 La Tabla 12 resume las propiedades del anticuerpo 83A10-TCB en comparación con el 83A10-TCVcv luego del paso de purificación con PA. La Tabla 13 resume las propiedades del anticuerpo 83A10-TCB en comparación con el 83A10-TCVcv luego de los pasos de purificación con PA y SEC. La Tabla 14 resume las propiedades del anticuerpo 83A10-TCB en comparación con el 83A10-TCVcv luego de los pasos de purificación PA y SEC más PA solo y luego cIEX y re-SEC. Para las Tablas 12 a 14, los valores en negrita resaltan la propiedad superior cuando se compararon 83A10-TCB vs. 83A10-TCVcv. Con una excepción (es decir rendimiento respectivamente cantidad, ver Tabla 13) que puede no ser representativa, todos los parámetros de producción/purificación y los valores que resultan de los 3 experimentos de comparación cabeza-a-cabeza fueron superior para el anticuerpo 83A10-TCBcv en comparación con el 83A10-TCB. Los resultados globales claramente demuestran que se pueden lograr las ventajas en las características de la producción/purificación cuando se aplican las modificaciones en la carga de CL-CH1 a los anticuerpos TCB y que solo dos pasos de purificación (es decir, cromatografía de afinidad en PA y SEC) son requeridos para lograr preparaciones de proteína de alta calidad con muy buenas propiedades de capacidad de desarrollo.

15 **Tabla 12:** Perfil de producción/purificación de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 T seguido del paso de purificación por cromatografía de afinidad en proteína A

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	61,3	<b>81,0</b>
Rendimiento (mg/L)	26,2	<b>51,5</b>
Cantidad (mg)	24,3	<b>50,2</b>
Monómero (%)	63,7	<b>68,2</b>
Molécula correcta por LC-MS (%)	n.d.	n.d

**Tabla 13:** Perfil de producción/purificación de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 seguido de los pasos de purificación por cromatografía de afinidad en proteína A y cromatografía de exclusión molecular

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	69,5	<b>91,0</b>
Rendimiento (mg/L)	<b>14,1</b>	10,3
Cantidad (mg)	<b>13,1</b>	10,0
Monómero (%)	74,7	<b>83,9</b>

Molécula correcta por LC-MS (%)	40-60	<b>90</b>
---------------------------------	-------	-----------

**Tabla 14:** Perfil de producción/purificación de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 seguido de los pasos de purificación por: 1.a) cromatografía de afinidad en proteína A y cromatografía de exclusión molecular y 1.b) cromatografía de afinidad en proteína A luego 2) cromatografía de intercambio catiónico y 3) finalmente cromatografía de exclusión molecular

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Pureza (%)	43,1	<b>96,2</b>
Rendimiento (mg/L)	0,43	<b>0,64</b>
Cantidad (mg)	0,73	<b>1,27</b>
Monómero (%)	98,3	<b>98,9</b>
Molécula correcta por LC-MS (%)	60-70%	<b>&gt;95%</b>

**Ejemplo 9: Estabilidad (agregación/fragmentación) de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 en el buffer de la formulación**

10 Para evaluar los anticuerpos anti-BCMA/anti-CD3 TCBcv y comparar su formato con el anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> para conocer su estabilidad con respecto a la agregación/fragmentación, se incubaron muestras por 10 días, preferentemente por 2 a 4 semanas a 37-40 °C en el buffer estándar de la formulación (por ej., 20 mM de citrato, 180 mM de sacarosa, 20 mM de arginina, 0,02 % de polisorbato 20 o por ej., 20 mM de histidina, 140 mM de NaCl, 0,01% de Tween20, pH 6,0) a una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/mL. Un control respectivo de muestra se guardó por 2-4 semanas a -80°C.

15 Para la cuantificación de los agregados y de las especies de bajo peso molecular (LMW), se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular por HPLC. Se aplicó una cantidad de 25 µg de proteína en una columna Tosoh TSKgel G3000SWXL en 5 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 mM de NaCl, 200 mM de Monoclorhidrato de L-Arginina, 0,02 % (w/v) de NaN<sub>3</sub>, pH 6,7 en un sistema HPLC Agilent 1200 (Agilent). La proteína eluida se cuantificó midiendo su absorbancia al UV a 280 nm.

20

**Ejemplo 10: Unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a las células recombinantes que expresan en su superficie BCMA humano, de mono cynomolgus o de ratón (citometría de flujo)**

d) La unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células HEK que expresan transitoriamente al BCMA de ratón (muBCMA-HEK) o al BCMA de cynomolgus (cyBCMA-HEK) se demostró mediante citometría de flujo. Brevemente, las células HEK que expresan BCMA fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30  $\mu$ l de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 o de los correspondientes anticuerpos TCB control durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 y los anticuerpos TCB control se titularon y analizaron en un rango de concentración final entre 2-300 nM. Luego, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120  $\mu$ l/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4°C con el fragmento de cabra F(ab')<sub>2</sub> anti-el fragmento específico Fc de IgG humana conjugado con el fluorocromo PE y purificado por afinidad (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Luego las células se lavaron dos veces con el buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se fijaron usando 100  $\mu$ l por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 120  $\mu$ l de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Cantoll. Como se muestra en la Figura 12, el anticuerpo 83A10-TCB se une a las células HEK que expresan transitoriamente al BCMA de ratón (A) y al BCMA de mono cynomolgus (B) de una manera específica y dependiente de la concentración, según lo medido como un aumento en la intensidad media de la fluorescencia. Como control negativo, el anticuerpo TCB DP47-TCB no se unió a las células muBCMA-HEK ni a las células cyBCMA-HEK. Las mismas propiedades de unión observadas con el anticuerpo 83A10-TCB se esperan con el anticuerpo 83A10-TCBcv dado que las CDR de las VL y VH son idénticas entre las dos moléculas (ver Ejemplo 19).

e) La unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células CHO que expresan establemente al BCMA de ratón, al BCMA de cynomolgus o BCMA también se demostró mediante citometría de flujo. Brevemente, las células HEK que expresan BCMA fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30  $\mu$ l de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 o de los correspondientes anticuerpos TCB control durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 y los anticuerpos TCB control se titularon y analizaron en un rango de concentración final entre 2-300 nM. Luego, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120  $\mu$ l/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4°C con el fragmento de cabra F(ab')<sub>2</sub> anti-el fragmento específico Fc de IgG humana conjugado con el fluorocromo PE y purificado por afinidad (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Luego las células se lavaron dos veces con el buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se fijaron usando 100  $\mu$ l por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 120  $\mu$ l de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Cantoll.

f) Unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a las células recombinantes que expresan establemente sobre su superficie al BCMA humano o al BCMA de mono cynomolgus según lo medido por citometría de flujo. La unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a la línea celular HEK293T que expresa establemente al BCMA humano (huBCMA-HEK293T) o al BCMA de cynomolgus (cynoBCMA-HEK293T) se demostró mediante citometría de flujo. La expresión del BCMA humano y del BCMA de cynomolgus en la superficie celular fue similar, según lo confirmado por la expresión intracelular de FLAG. Brevemente, las células HEK293T que expresan BCMA fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 30  $\mu$ l de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 o de los correspondientes anticuerpos TCB control durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 y los anticuerpos TCB control se titularon y analizaron en un rango de concentración final entre 2-300 nM. Luego, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron con 120  $\mu$ l/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se incubaron durante 30 min adicionales a 4°C con el fragmento de cabra F(ab')<sub>2</sub> anti-el fragmento específico Fc de IgG humana conjugado con el fluorocromo PE y purificado por afinidad (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Luego las células se lavaron dos veces con el buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se fijaron usando 100  $\mu$ l por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 120  $\mu$ l de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Cantoll. Se midieron los valores de EC50 de unión del anticuerpo 83A10-TCBcv a las células huBCMA-HEK293T y a las células cynoBCMA-HEK293T (Tabla 14A).

**Tabla 14A:** Unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a las células HEK293T que expresan en la superficie los mismos niveles de BCMA humana y BCMA de cynomolgus.

Anticuerpos BCMA-TCB	EC50 (nM) de la unión celular	
	huBCMA-HEK293T	cynoBCMA-HEK293T
83A10-TCBcv	15,6	7,8

**Ejemplo 11: Unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a las líneas celulares de mieloma múltiple BCMA-positivas (citometría de flujo)**

5 Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 (13A4-TCBcv, 17A5-TCBcv, 83A10-TCBcv) fueron analizados mediante  
 10 citometría de flujo por unirse al BCMA humano en las células que expresan BCMA, H929 y L363. Las células  
 MKN45 (línea celular humana de adenocarcinoma gástrico que no expresa BCMA) se usaron como control negativo.  
 Brevemente, las células cultivadas fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las  
 15 células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD  
 Biosciences). Se alicuotaron 100  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo  
 Redondo y se incubaron con 30  $\mu$ l de los anticuerpos anti-BCMA o de los correspondientes anticuerpos control de  
 IgG durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 (y los anticuerpos TCB control) se  
 20 titularon y analizaron en un rango de concentración final entre 1-300 nM. Luego, la células se centrifugaron (5 min,  
 350 x g), se lavaron con 120  $\mu$ l/pocillo del buffer de tinción para FACS (BD Biosciences), se resuspendieron y se  
 incubaron durante 30 min adicionales a 4°C con el fragmento de cabra F(ab')<sub>2</sub> anti-el fragmento específico Fc de  
 IgG humana conjugado con el fluorocromo PE y purificado por afinidad (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-  
 170), se fijaron usando 100  $\mu$ l por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20  
 min, se resuspendieron en 120  $\mu$ l de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Cantoll.  
 Como se muestra en la Figura 13, la intensidad media de fluorescencia de los anticuerpos anti-BCMA/anti-CD3 se  
 25 graficó en función de la concentración de anticuerpo; (A) 83A10-TCBcv en células H929 y en células MKN45, (B)  
 17A5-TCBcv en células H929 y en células MKN45, (C) 13A4-TCBcv en células H929 y en células MKN45. Cuando  
 correspondía, los valores de EC50 se calcularon usando Prism GraphPad (LaJolla, CA, USA) y los valores de EC50  
 que denotaron la concentración requerida de anticuerpo para alcanzar el 50% de la máxima unión de los anticuerpos  
 TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células H929 se resumen en la Tabla 15. La Tabla 15A muestra los valores de EC50  
 de la unión de los anticuerpos 83A10-TCBcv a las células de MM L363.

25 **Tabla 15:** Valores de EC50 de la unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células H929

Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (nM)	EC50 ( $\mu$ g/ml)
83A10-TCB (Experimento 1)	9,8	1,9
83A10-TCBcv (Experimento 1)	14,5	2,4
83A10-TCB (Experimento 2)	16,9	3,25
83A10-TCBcv (Experimento 2)	14,5	2,4
83A10-TCBcv (Experimento 3)	12,0	1.725

17A5-TCBcv	no hay valor de EC50	no hay valor de EC50
------------	----------------------	----------------------

**Tabla 15A:** Valores de EC50 de la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a las células de mieloma múltiple L363

EC50 estimado	83A10-TCBcv
nM	17,4
µg/ml	2,507

5 **Ejemplo 12: Unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a la línea celular de células T Jurkat CD3-positiva (citometría de flujo)**

Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 (13A4-TCBcv, 17A5-TCBcv, 83A10-TCBcv) fueron también analizados mediante citometría de flujo por sus propiedades de unión al CD3 humano expresado en las células Jurkat derivadas de la leucemia de células T (ATCC TIB-152). Las células Jurkat fueron cultivadas en RPMI suplementado con 10% de FCS inactivado con calor. Brevemente, las células cultivadas fueron cosechadas, contadas y la viabilidad celular se evaluó usando ViCell. Las células viables se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100 µl por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo. Se añadieron 30 µl de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 o de los correspondientes anticuerpos control de IgG a los pocillos que contenían a las células a una concentración final de 3 nM a 500 nM o de 0,1 pM a 200 nM. Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 y el control de IgG se usaron a la misma molaridad. Luego de incubar durante 30 min a 4°C, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g), se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo del buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences), luego las células se fijaron usando 100 µl por pocillo del buffer de fijación de BD (#BD Biosciences, 554655) a 4°C durante 20 min, se resuspendieron en 120 µl de buffer FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Cantoll. Se evaluó la unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células T y se determinó la intensidad media de fluorescencia en la población seleccionada de células Jurkat que expresan CD3 y se graficó en histogramas o dot plots. La Figura 14 muestra la intensidad media de fluorescencia para la unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 (83A10-TCBcv (A); 17A5-TCBcv (B)) a las células Jurkat y se graficó en función de la concentración de anticuerpo. No se alcanzaron los valores de EC50 ni los de la máxima unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células Jurkat CD3-positivas. El anticuerpo control de isotipo no se unió a las células Jurkat y los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 ((A), 83A10-TCBcv); (B) 17A5-TCBcv) no se unieron a las células MKN45 BCMA-negativas y CD3-negativas.

30 **Ejemplo 13: Anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 no bloquean la activación de NF-κB dependiente de APRIL evidenciándose mediante la detección intracelular de NF-κB fosforilado (citometría de flujo)**

Para evaluar si los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 bloquean o inducen la activación de NF-κB de manera dependiente de APRIL, se midió por citometría de flujo la detección intracelular de NF-κB fosforilado, tal como se describió in Lafarge et al. BMC Molecular Biol 2007; 8:64. El método de citometría de flujo es una alternativa para la detección de la activación de NF-κB al ensayo de ELISA luminiscente, el cual no es lo suficientemente sensible y contiene pasos muy laboriosos (Perez and Nolan. Nat Biotechnol 2002; 20(2):155-62). Se evaluó si la unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células de mieloma H929 BCMA-positivas bloquea o induce la activación de NF-κB dependiente de APRIL, una conocida vía de señalización del factor nuclear corriente abajo del receptor

BCMA. Brevemente, a las células H929 se las cultivó en RPMI 1640 sin FCS durante 24 h a 37°C en una estufa para células. Luego del período de incubación, las células se cosecharon, contaron y se evaluó la viabilidad celular usando el ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 25  $\mu$ l de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 o de los anticuerpos control de isotipo a una concentración saturada de 400 nM (77  $\mu$ g/ml) durante 20 min a 37°C seguidos de una incubación directa con 100 ng/mL o 1  $\mu$ g/mL o concentraciones saturadas de 3  $\mu$ g/mL a 5  $\mu$ g/mL de la proteína recombinante de ratón  $\Delta$ -APRIL (R&D Systems Europe) durante 15 min adicionales a 37°C. Como control negativo, se usaron células sin tratar o células que se incubaron con los correspondientes anticuerpos control del isotipo IgG a 400 nM (77  $\mu$ g/ml) durante un total de 45 min a 37°C. Como control positivo, se usaron células solamente incubadas con 100 ng/mL o 1  $\mu$ g/ml de la proteína recombinante de ratón  $\Delta$ -APRIL (R&D Systems Europe) durante 15 min a 37°C. Al finalizar la estimulación, las células se centrifugaron (360 x g, 4 min), el sedimento celular se fijó inmediatamente en el buffer Cytofix (BD Biosciences, #554655) pre-calentado y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Las células luego se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y los sedimentos celulares se rompieron con un vórtex. Posteriormente, las células se permeabilizaron en el buffer Phosflow Perm III (BD Biosciences, #558050) frío durante 30 min en hielo. Luego las células se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y los sedimentos celulares se rompieron con un vórtex. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l del buffer Phosflow Perm III y las células permeabilizadas se tiñeron con el anticuerpo anti-NF- $\kappa$ B p65 (pS529) (BD Biosciences, #558423) o con un anticuerpo control de isotipo (IgG2b de ratón,  $\kappa$ , BD Biosciences #555058) durante 60 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Después del período de tinción, las células se lavaron con PBS + 0,1% BSA en PBS + 0,1% BSA antes del análisis citométrico. Se midió la intensidad media de fluorescencia relativa en las células H929 tratadas de acuerdo a lo descrito anteriormente. La señal de intensidad media de fluorescencia (MFI) obtenido luego de la unión de  $\Delta$ -APRIL en presencia del control de isotipo se estableció como 1; las otras señales se normalizaron con este valor. Como se muestra en la Figura 15, se evaluó el efecto de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 con un brazo de unión a BCMA que no compite con APRIL (83A10-TCBcv) comparado con un brazo de unión a BCMA que compite con APRIL (J6M0-TCB) sobre la activación de NF- $\kappa$ B mediada por 1.000 ng/mL de APRIL en células H929 (A). En comparación con las células H929 en presencia de 1.000 ng/mL de APRIL, el anticuerpo 83A10-TCBcv que no compite con APRIL disminuyó en un 29,9% la señal de activación de NF- $\kappa$ B inducida por APRIL (A). Considerando que podría haber aproximadamente una variabilidad experimental del 20%, los anticuerpos 83A10-TCBcv mostraron una mínima disminución de la fosforilación de NF- $\kappa$ B mediada por APRIL. Por el contrario, cuando el brazo de unión a BCMA que compite con APRIL J6M0-TCB se comparó con las células H929 en presencia de 1.000 ng/mL de APRIL, hubo una disminución de al menos un 79,3% en la señal de activación de NF- $\kappa$ B cuando se midió por citometría de flujo. Se ha documentado que el anticuerpo anti-BCMA J6M0 (WO2012163805) bloquea la activación de NF- $\kappa$ B inducida por APRIL. El anticuerpo J6M0-TCB se generó usando exactamente el mismo formato TCB que el anticuerpo 83A10-TCBcv.

En un segundo set de experimentos, se verificó el efecto de los anticuerpos 83A10-TCBcv que no compiten con APRIL y de los anticuerpos J6M0-TCB que compiten con APRIL, en presencia de concentraciones saturadas de APRIL, es decir, 5.000 ng/mL, las cuales indujeron una señal de activación de NF- $\kappa$ B más fuerte en las células H929, y se confirmaron las primeras observaciones usando la técnica de citometría de flujo. En comparación con las células H929 en presencia de 5.000 ng/mL de APRIL, se observó un aumento del 30% en la activación de NF- $\kappa$ B con el anticuerpo 83A10-TCBcv que no compite con APRIL (Figura 15B). Sin embargo, considerando que se tiene todavía una variabilidad experimental del 20-30%, no se puede concluir que haya un aumento o una disminución de la señal de activación para los anticuerpos 83A10-TCBcv. Por otra parte, cuando se comparó el anticuerpo J6M0-TCB que compite con APRIL con las células H929 en presencia de 5.000 ng/mL de APRIL, se produjo una disminución del 60% en la señal de activación de NF- $\kappa$ B al medirse por citometría de flujo, aun considerando la variabilidad del ensayo, esta sí es una disminución de la señal de activación.

Los resultados globales se corroboran con el set de datos obtenido en los estudios de competencia con APRIL, por la unión al BCMA y a las células BCMA-positivas (Figuras 5-8) y confirman que el anticuerpo IgG anti-BCMA 83A10 y el 83A10-TCBcv mínimamente compiten con APRIL y no bloquean o mínimamente bloquean la unión de APRIL al BCMA de las células como así también mínimamente afectan la vía de transducción de señales corriente abajo NF- $\kappa$ B luego de la unión de APRIL al BCMA de las células. Los resultados actuales también confirman que el anticuerpo J6M0 es un anticuerpo anti-BCMA que compite con APRIL por la unión al BCMA y que bloquea la señalización corriente abajo de APRIL.

**Ejemplo 14: Anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 no inducen directamente la activación de NF- $\kappa$ B medida como NF- $\kappa$ B fosforilado en ausencia de APRIL exógena (citometría de flujo)**

Se evaluó si la unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células de mieloma H929 BCMA-positivas induce la activación de NF- $\kappa$ B, una conocida vía de señalización del factor nuclear corriente abajo del receptor BCMA. Brevemente, a las células H929 se las cultivó en RPMI 1640 sin FCS durante 24 h a 37°C en una estufa para células. Luego del período de incubación, las células se cosecharon, contaron y se evaluó la viabilidad celular usando el ViCell. Las células viables se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml en un buffer de tinción para FACS que contiene BSA (BD Biosciences). Se alicuotaron 100  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se incubaron con 25  $\mu$ l de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 o de los anticuerpos control de isotipo a una concentración saturada de 400 nM (77  $\mu$ g/ml) durante 20 min a 37°C seguidos de una incubación directa con 100 ng/mL o 1  $\mu$ g/mL o concentraciones saturadas de 3  $\mu$ g/mL a 5  $\mu$ g/mL de la proteína recombinante de ratón  $\Delta$ -APRIL (R&D Systems Europe) durante 15 min adicionales a 37°C. Como control negativo, se usaron células sin tratar o células que se incubaron con los correspondientes anticuerpos control del isotipo IgG a 400 nM (77  $\mu$ g/ml) durante un total de 45 min a 37°C. Como control positivo, se usaron células solamente incubadas con 100 ng/mL o 1  $\mu$ g/ml de la proteína recombinante de ratón  $\Delta$ -APRIL (R&D Systems Europe) durante 15 min a 37°C para demostrar que se detecta una señal positiva, y que la falta o la presencia de una mínima señal no es debida a un error técnico. Al finalizar la estimulación, las células se centrifugaron 360 x g, 4 min), el sedimento celular se fijó inmediatamente en el buffer Cytotfix (BD Biosciences, #554655) pre-calentado y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Las células luego se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y los sedimentos celulares se rompieron con un vórtex. Posteriormente, las células se permeabilizaron en el buffer Phosflow Perm III (BD Biosciences, #558050) frío durante 30 min en hielo. Luego las células se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y los sedimentos celulares se rompieron con un vórtex. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L del buffer Phosflow Perm III y las células permeabilizadas se tiñeron con el anticuerpo anti-NF- $\kappa$ B p65 (pS529) (BD Biosciences, #558423) o con un anticuerpo control de isotipo (IgG2b de ratón,  $\kappa$ , BD Biosciences #555058) durante 60 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Después del período de tinción, las células se lavaron con PBS + 0,1% BSA en PBS + 0,1% BSA antes del análisis por citometría de flujo. Se midió la intensidad media de fluorescencia relativa en las células H929 tratadas de acuerdo a lo descrito anteriormente. La señal de intensidad media de fluorescencia obtenida luego de la unión de  $\Delta$ -APRIL en presencia del control de isotipo se estableció como 1; las otras señales se normalizaron con este valor. En la Figura 16 se muestra el efecto de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 (83A10-TCBcv) en la señalización de NF- $\kappa$ B luego de unirse a las células H929 en ausencia de APRIL exógena. La Figura 16A muestra que la unión del anticuerpo anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv a las células H929 no causó ningún incremento en la activación de NF- $\kappa$ B en ausencia de APRIL aunque una ligera disminución del 18,1% de la señal basal fue observada, la cual está contemplada dentro de la variabilidad experimental, en comparación con las células H929 solas, al medir la detección intracelular de NF- $\kappa$ B p65 (pS529) por citómetro de flujo. Esta observación fue confirmada en un segundo experimento en el que se demostró que los anticuerpos anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv no inhibieron ni indujeron la activación de NF- $\kappa$ B al unirse a las células H929 BCMA-positivas (Figura 16B). Como se documentó previamente en publicaciones pasadas, las células de mieloma H929 presentan un nivel basal de activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, una característica patológica conocida de las líneas celulares de mieloma múltiple (Demchenko et al., Blood 2010; 115 (17): 3541-3552). La falta de activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B luego de la unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 a las células BCMA-positivas puede ser ventajosa, especialmente debido a la mayor afinidad de unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 al BCMA de las células tumorales vs. al CD3 de las células T. Además, es preferible que la vía de señalización de NF- $\kappa$ B no sea adicionalmente activada y que la supervivencia de las células de mieloma esté incrementada cuando los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 se unan temporalmente a las células de mieloma BCMA-positivas sin unirse a las células T.

**Ejemplo 15: Activación de las células T humanas luego de la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 con las células T CD3-positivas y las líneas celulares de mieloma múltiple BCMA-positivas (Citometría de flujo)**

Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 fueron analizados por su capacidad de inducir la activación de las células T mediante citometría de flujo al evaluar la expresión del marcador de superficie de activación temprana CD69, o el marcador de superficie de activación tardía CD25 en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en presencia o ausencia de las células humanas de MM que expresan BCMA. Brevemente, las células H929 BCMA-positivas se cosecharon con el buffer de disociación celular, se contaron y se chequeó su viabilidad. Las células se ajustaron a  $0,3 \times 10^6$  células (viables) por ml en medio RPMI-1640 modificado, se pipetearon 100  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular en placas de 96 pocillos con fondo redondo (como se indica). Se añadieron a los pocillos que contenían a las células, 50  $\mu$ l de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 diluidos a una concentración final de 0,3 pM – 30 nM. Las células efectoras PBMC humanas se aislaron a partir de sangre fresca de un donante sano y se ajustaron a  $6 \times 10^6$  células (viables) por ml en medio RPMI-1640 modificado. Se añadieron 50  $\mu$ l por pocillo de esta suspensión celular para obtener una relación E:T final de PBMC con respecto a las células tumorales de mieloma de 10:1. Para analizar si los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 son capaces de activar específicamente a las células T en presencia de

las células blanco que expresan BCMA humana, se incluyeron los pocillos que contenían 3nM de las respectivas moléculas de TCB anti-BCMA/anti-CD3 como así también de las PBMC, pero no las células blanco. Luego de incubar 15-28 h (CD69), o 24-48 h (CD25) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, las células se centrifugaron (5 min, 350 x g) y se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS conteniendo 0,1% BSA. La tinción de los marcadores de superficie CD4 (IgG1 de ratón, K; clon RPA-T4), CD8 (IgG1 de ratón, K; clon HIT8a; BD #555635), CD69 (IgG1 de ratón; clon L78; BD #340560) y CD25 (IgG1 de ratón, K; clon M-A251; BD #555434) se realizó 4°C durante 30 min, de acuerdo con las sugerencias del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS conteniendo 0,1% BSA y se fijaron durante 15 min a 4°C, usando 100 µl/pocillo de buffer de fijación (BD #554655). Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con 0,1% BSA y se analizaron usando un citómetro de flujo FACS Cantoll machine (Software FACS Diva). La Figura 17 muestra el nivel de expresión del marcador de activación temprana CD69 (C, D), y del marcador de activación tardía CD25 (A, B) en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> luego de 48 horas de incubación (resultados representativos de dos experimentos independientes). El anticuerpo 83A10-TCBcv indujo un aumento en la regulación de los marcadores de activación CD69 y CD25 de una manera dependiente de la concentración y de una manera específica en presencia de las células blanco BCMA-positivas. No se observó activación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> cuando las PBMC humanas se trataron con el anticuerpo control DP47-TCB, lo cual sugiere que a pesar de unirse al CD3 de las células T, no se produce la activación de las células T cuando el anticuerpo TCB no se une a las células blanco BCMA-positivas (datos no mostrados).

**Ejemplo 16: Producción de citocinas por parte de las células T activadas luego de la unión de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 a las células T CD3-positivas y a las líneas celulares de mieloma múltiple BCMA-positivas (análisis de CBA de liberación de citocinas)**

Los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 fueron analizados por su capacidad de inducir la producción de novo de citocinas mediada por las células T en presencia o ausencia de células humanas de MM que expresan BCMA. Brevemente, las PBMC humanas se aislaron de las capas leucocitarias y se plaquearon 0,3 millones de células en placas de 96 pocillos con fondo redondo. Alternativamente, se plaquearon por pocillo 280 µl de sangre entera provenientes de un donante sano en placas de 96 pocillos de pocillos profundos. Se añadieron las células tumorales blanco (por ej., las células de mieloma H929, RPMI-8226, U266, o L363) para obtener una relación E:T final de 10:1. Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 y los controles se añadieron a una concentración final de 0,3 pM – 30 nM. Luego de una incubación de hasta 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, la placa a ensayar se centrifugó por 5 min a 350 x g y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos de pocillos profundos para el subsiguiente análisis. El análisis de CBA se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACS Cantoll de acuerdo con las instrucciones del fabricante, ya sea usando el equipo comercial de citocinas humanas Th1/Th2 Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD #551809) o la combinación de los siguientes Sets para Flex de CBA: granzima B humana (BD #560304), Set para Flex de IFN-γ humano (BD #558269), Set para Flex de TNF humano (BD #558273), Set para Flex de IL-10 humana (BD #558274), Set para Flex de IL- 6 humana (BD #558276), Set para Flex de IL-4 humana (BD #558272), Set para Flex de IL-2 humana (BD #558270). Las Tablas 15C y 15D muestran los valores de EC50 y la cantidad de citocinas/proteasas secretadas para cada una de las concentraciones del anticuerpo biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 cuando se usaron las células tumorales blanco H929 y RPMI-8226, respectivamente.

**Tabla 15C.** Secreción de citocinas y proteasas inducidas por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en presencia de las células H929

Citocinas/ proteasas	EC50 (nM)	Concentración de 83A10-TCBcv (nM)						
		0,0002	0,0013	0,008	0,046	0,28	1,67	10
IFN-γ (pg/mL)	3,25	4,34	5,97	18,13	123,02	820,91	1.563,53	2.768,75
IL-2 (pg/mL)	0,22	153,81	154,25	156,48	166,46	202,94	238,43	239,50



TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,99	10,39	10,84	13,81	34,46	162,79	209,01	463,95
IL-10 (pg/mL)	2,31	23,64	24,14	20,96	24,08	29,03	46,54	70,88
Granzima B (pg/mL)	13,5	161,58	140,50	229,89	874,36	2.425,32	5.772,46	12.018,26
IL-6 (pg/mL)	/	11,28	10,55	12,58	24,19	46,57	68,79	193,07

**Tabla 15D.** Secreción de citocinas y proteasas inducidas por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en presencia de las células RPMI-8226

Citocinas/ proteasas	EC50 (nM)	Concentración de 83A10-TCBcv (nM)						
		0,00064	0,0032	0,016	0,08	0,4	2	10
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,52	-6,95	-6,49	-0,65	46,72	161,24	315,11	371,47
IL-10 (pg/mL)	0,30	-9,21	1,95	25,17	125,82	401,42	602,64	680,05
Granzima B (pg/mL)	0,34	220,54	331,55	889,13	5.855,02	15.862,84	21.270,43	27.120,52

5

**Ejemplo 17:** Citotoxicidad redirigida por parte de las células T a las células transfectadas con BCMA de cynomolgus inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación de la LDH)

a) Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron por su capacidad de inducir la apoptosis mediada por las células T en las células CHO que expresan BCMA de mono cynomolgus tras el entrecruzamiento de la construcción vía la unión de los motivos de unión al antígeno al BCMA sobre la superficie de las células. Brevemente, se cosecharon células blanco CHO que expresan BCMA de mono cynomolgus con un buffer de disociación, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Aproximadamente, se plaquearon 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se añadió la respectiva dilución de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); las concentraciones finales estaban dentro del rango de 0,1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones de TCB y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se usaron PBMC de mono cynomolgus como células efectoras, en una relación E:T final 10:1. Los grupos correspondientes al control negativo presentaron solamente las células efectoras o blanco. Como control positivo para la activación de las células T de mono cynomolgus, se usó 1 µg/ml de PHA-M (Sigma #L8902). Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células blanco CHO que expresan BCMA de mono cynomolgus (= 100%) mediante la incubación de dichas células blanco a una concentración final de 1% Tritón X-100, induciendo así la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células blanco co-incubadas con solamente las células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico para células T. Luego de 20-24 h de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se midió la liberación de la LDH de las células blanco CHO que expresan BCMA de mono cynomolgus apoptóticas/necróticas en los sobrenadantes celulares utilizando el equipo comercial LDH detection kit (Roche Applied Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de la LDH se graficó en función de las concentraciones de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en una curva dosis-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el programa Prism software (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo TCB que resulta en el 50% de la liberación máxima de la LDH.

b) Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron por su capacidad de inducir la apoptosis mediada por las células T en las células HEK293T que expresan BCMA de mono cynomolgus tras el entrecruzamiento de la construcción vía la unión de los motivos de unión al antígeno al BCMA sobre la superficie de las células. Brevemente, se cosecharon células blanco HEK293T que expresan BCMA de mono cynomolgus con un buffer de disociación, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Aproximadamente, se plaquearon 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se añadió la respectiva dilución de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); las concentraciones finales estaban dentro del rango de 0,1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones de TCB y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se usaron PBMC de mono cynomolgus como células efectoras, en una relación E:T final 10:1. Los grupos correspondientes al control negativo presentaron solamente las células efectoras o blanco. Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células blanco HEK que expresan BCMA de mono cynomolgus (= 100%) mediante la incubación de dichas células blanco a una concentración final de 1% Tritón X-100, induciendo así la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células blanco co-incubadas con solamente las células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico para células T. Luego de 20-24 h de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se midió la liberación de la LDH de las células blanco HEK que expresan BCMA de mono cynomolgus apoptóticas/necróticas en los sobrenadantes celulares utilizando el equipo comercial LDH detection kit (Roche Applied Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de la LDH se graficó en función de las concentraciones de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en una curva dosis-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el programa Prism software (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo TCB que resulta en el 50% de la liberación máxima de la LDH. La Tabla 15E muestra los valores de EC50 de lisis de las células blanco cynoBCMA-HEK por los anticuerpos 83A10-TCBcv.

**Tabla 15E.** Valores de EC50 de la potencia de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 para inducir la lisis de las células cynoBCMA-HEK

Células blanco	Células efectoras	EC50 (pM)
		83A10-TCBcv

CynoBCMA-HEK	Cyno PBMCs donante 1	3,5
CynoBCMA-HEK	Cyno PBMCs donante 2	2,7
EC50 Promedio=		3,1± 0,57

**Ejemplo 18: Citotoxicidad redirigida por parte de las células T a las células de mieloma H929 con alta expresión del BCMA inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación de la LDH)**

5 Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 también se analizaron por su capacidad de inducir la apoptosis mediada por las células T en las células de MM con alta expresión del BCMA tras el entrecruzamiento de la construcción vía la unión de los motivos de unión al antígeno al BCMA sobre la superficie de las células. Brevemente, se cosecharon células blanco humanas de mieloma múltiple H929 con alta expresión del BCMA con un buffer de disociación, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Aproximadamente, se plaquearon 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se añadió la respectiva dilución de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); las concentraciones finales estaban dentro del rango de 0,1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones de TCB y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron las células T humanas totales (efectoras) en los pocillos para obtener una relación E:T final de 5:1. Cuando las PBMC humanas son usadas como células efectoras, se usa una relación E:T final 10:1. Los grupos correspondientes al control negativo presentaron solamente las células efectoras o blanco. Como control positivo para la activación de todas las células T humanas, se usó 1 µg/ml de PHA-M (Sigma #L8902). Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células blanco de MM (= 100%) mediante la incubación de dichas células blanco a una concentración final de 1% Tritón X-100, induciendo así la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células blanco co-incubadas con solamente las células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico para células T. Luego de 20-24 h o 48h de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se midió la liberación de la LDH de las células blanco de MM apoptóticas/necróticas en los sobrenadantes celulares utilizando el equipo comercial LDH detection kit (Roche Applied Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de la LDH se graficó en función de las concentraciones de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en una curva dosis-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el programa Prism software (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo TCB que resulta en el 50% de la liberación máxima de la LDH. Como se observa en la Figura 18, los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 ((A) 83A10-TCBcv, (B) 17A5-TCBcv) indujeron la muerte de una manera dependiente de la concentración de las células de mieloma H929 BCMA-positivas, tal como lo indican los resultados de la medición de la liberación de la LDH. La muerte de las células H929 fue específica dado que el anticuerpo control DP47-TCB que no se une a las células blanco BCMA-positivas no indujo la liberación de la LDH, aún a la mayor concentración ensayada (datos no mostrados). Las Tablas 16 y 16A resumen los valores de EC50 de la muerte redirigida por parte de las células T a las células H929 BCMA-positivas inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3. En algún experimento, el anticuerpo 83A10-TCBcv fue comparado con el anticuerpo TCB que le compete por el ligando APRIL/BAFF, el J6M0-TCB en inducir la muerte de las células H929 (Tabla 16A). La Figura 18-1 muestra que el anticuerpo 83A10-TCBcv indujo de una manera dependiente de la concentración la muerte de las células de mieloma H929 BCMA-positivas, tal como lo indican los resultados de la medición de la liberación de la LDH. La lisis de las células H929 fue específica dado que el anticuerpo control-TCB que se une solo al CD3 de las células T y no se une a las células blanco BCMA-positivas no indujo la liberación de la LDH, aún a la mayor concentración ensayada.

40 **Tabla 16:** Valores de EC50 de muerte redirigida por parte de las células T a las células H929 inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3

Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)	EC50 (µg/ml)
----------------------------------	-----------	--------------

83A10-TCBcv (Experimento 1)	Bajo orden de pM r (aprox. <20)	Un solo dígito
83A10-TCBcv (Experimento 2)	1,5	0,29
17A5-TCBcv	197	37,9

**Tabla 16A:** Valores de EC50 de muerte redirigida por parte de las células T a las células H929 inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3

Anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)					
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6
83A10-TCBcv	3,9	/	8,5	5,0	4,3	1,5
J6M0-TCBcv	/	/	/	/	/	5,8

**5 Ejemplo 19: Citotoxicidad redirigida por parte de las células T a las células de mieloma U266BI y/o L363 con baja expresión del BCMA inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación de la LDH)**

Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron por su capacidad de inducir la apoptosis mediada por las células T en las células de MM con baja expresión del BCMA tras el entrecruzamiento de la construcción vía la unión de los motivos de unión al antígeno al BCMA sobre la superficie de las células. Brevemente, se cosecharon células blanco humanas de mieloma múltiple U266 y/o L363 con baja expresión del BCMA con un buffer de disociación, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Aproximadamente, se plaquearon 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondo y se añadió la respectiva dilución de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); las concentraciones finales estaban dentro del rango de 0,1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones de TCB y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron las células T humanas totales (efectoras) en los pocillos para obtener una relación E:T final de 5:1. Cuando las PBMC humanas son usadas como células efectoras, se usa una relación E:T final 10:1. Los grupos correspondientes al control negativo presentaron solamente las células efectoras o blanco. Como control positivo para la activación de todas las células T humanas, se usó 1 µg/ml de PHA-M (Sigma #L8902). Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células blanco MM (= 100%) mediante la incubación de dichas células blanco a una concentración final de 1% Tritón X-100, induciendo así la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células blanco co-incubadas con solamente las células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico para células T. Luego de 20-24 h de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se midió la liberación de la LDH de las células blanco de MM apoptóticas/necróticas en los sobrenadantes celulares utilizando el equipo comercial LDH detection kit (Roche Applied Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de la LDH se graficó en función de las concentraciones de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en una curva dosis-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el programa Prism software (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo TCB que resulta en el 50% de la liberación máxima de la LDH. Como se observa en la Figura 18-2, el anticuerpo TCB anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv indujo la muerte de una manera dependiente de la concentración de las células de mieloma L363 BCMA-positivas, tal como lo indican los resultados de la medición de la liberación de la LDH. La lisis de las células L363 fue específica dado que el anticuerpo control-TCB que se une solo al CD3 de las células T y no

se une a las células blanco BCMA-positivas no indujo la liberación de la LDH, aún a la mayor concentración ensayada. La Tabla 16B resume los valores de EC50 de la muerte redirigida por parte de las células T de las células L363 con baja expresión del BCMA inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3.

5 **Tabla 16B:** Valores de EC50 de muerte redirigida por parte de las células T a las células L363 inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3

Anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5
83A10-TCBcv	16,8	47,8	28,4	12,6	39,0

**Ejemplo 19A: Citotoxicidad redirigida por parte de las células T a las células de mieloma RPMI-8226 de expresión media/baja del BCMA inducida por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (ensayo de liberación de la LDH)**

10 Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron por su capacidad de inducir la apoptosis mediada por las células T en las células de MM con expresión media/baja del BCMA tras el entrecruzamiento de la construcción vía la unión de los motivos de unión al antígeno al BCMA sobre la superficie de las células. Brevemente, se cosecharon células blanco humanas de mieloma múltiple L363 con expresión media/baja del BCMA con un buffer de disociación, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Aproximadamente, se plaquearon 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondeado y se añadió la respectiva dilución de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); las concentraciones finales estaban dentro del rango de 0,1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones de TCB y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron las PBMC humanas (efectoras) en los pocillos para obtener una relación E:T final de 10:1, correspondientes a una relación E:T de aproximadamente 3 a 5 células por cada 1 célula tumoral blanco. Los grupos correspondientes al control negativo presentaron solamente las células efectoras o blanco. Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células blanco de MM (= 100%) mediante la incubación de dichas células blanco a una concentración final de 1% Tritón X-100, induciendo así la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células blanco co-incubadas con solamente las células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico para células T. Luego de 20-24 h de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se midió la liberación de la LDH de las células blanco de MM apoptóticas/necróticas en los sobrenadantes celulares utilizando el equipo comercial LDH detection kit (Roche Applied Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de la LDH se graficó en función de las concentraciones de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 en una curva dosis-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el programa Prism software (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo TCB que resulta en el 50% de la liberación máxima de la LDH. Como se observa en la Figura 18-3, el anticuerpo TCB anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv indujo la muerte de una manera dependiente de la concentración de las células de mieloma RPMI-8226 BCMA-positivas, tal como lo indican los resultados de la medición de la liberación de la LDH. La lisis de las células RPMI-8226 fue específica dado que el anticuerpo control-TCB que se une solo al CD3 de las células T y no se une a las células blanco BCMA-positivas no indujo la liberación de la LDH, aún a la mayor concentración ensayada. La Tabla 16C resume los valores de EC50 de la muerte redirigida por parte de las células T de las células RPMI-8226 de expresión media/baja del BCMA inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3.

**Tabla 16C:** Valores de EC50 de muerte redirigida por parte de las células T a las células RPMI-8226 inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3

Anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5
83A10-TCBcv	/	620,5	229,3	35,0	64,9

**Ejemplo 19B: Citotoxicidad redirigida por parte de las células T a las células de mieloma J2N-3 con baja expresión del BCMA inducidas por los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (citometría de flujo y liberación de la LDH)**

5 Los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 se analizaron por su capacidad de inducir la apoptosis mediada por las células T en las células de MM con baja expresión del BCMA tras el entrecruzamiento de la construcción vía la unión de los motivos de unión al antígeno al BCMA sobre la superficie de las células. Brevemente, se cosecharon células blanco humanas de mieloma múltiple J2N-3 con baja expresión del BCMA con un buffer de disociación, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Aproximadamente, se  
10 plaquearon 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondeado y se añadió la respectiva dilución de la construcción para una concentración final deseada (por triplicado); las concentraciones finales estaban dentro del rango de 0,1 pM a 10 nM. Para una comparación adecuada, todas las construcciones de TCB y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron las PBMC humanas (efectoras) en los pocillos para obtener una relación E:T final de 10:1, correspondientes a una relación E:T de aproximadamente 3 a 5 células por  
15 cada 1 célula tumoral blanco. Los grupos correspondientes al control negativo presentaron solamente las células efectoras o blanco. Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células blanco de MM (= 100%) mediante la incubación de dichas células blanco a una concentración final de 1% Tritón X-100, induciendo así la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células blanco co-incubadas con solamente las células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico para células T. i) Luego de 48 h de incubación a 37°C, 5%  
20 CO<sub>2</sub>, las células cultivadas de mieloma se lavaron y tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromos y con anexina-V para la determinación de las células de mieloma apoptóticas. El panel de tinción comprendió CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/Anexina-V-PerCP-Cy5.5. Los anticuerpos marcados con fluorocromos se adquirieron en BD Biosciences (San Jose, CA) y Caltag Laboratories (San Francisco CA). La adquisición se realizó usando un citómetro de flujo multicolor con su programa instalado  
25 (por e j., Cantoll device running FACS Diva software o con el citómetro de flujo FACSCalibur usando el programa CellQUEST software). El programa Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences) se usó para el análisis de los datos. Se midió la anexina-V en las células J2N-3 y el porcentaje de células J2N-3 anexina-V-positivas se graficó en función de la concentración de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3. También se determinó el porcentaje de lisis de las células J2N-3 inducida por una concentración específica del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 al medir el recuento absoluto de las células J2N-3 anexina-V-negativas en presencia  
30 de una determinada concentración del TCB y restando dicho valor del recuento absoluto de las células J2N-3 anexina-V-negativas en ausencia del TCB; dividido por el recuento absoluto de las células J2N-3 anexina-V-negativas en ausencia del TCB. La Figura 18-4 muestra que el anticuerpo TCB 83A10-TCBcv y anti-BCMA/anti-CD3 indujeron la muerte de una manera dependiente de la concentración de las células de mieloma J2N-3 con baja expresión del BCMA como se midió por citometría de flujo. La lisis de las células J2N-3 fue específica dado que el anticuerpo control-TCB que se une solo al CD3 de las células T y no se une a las células blanco BCMA-positivas no indujo un aumento de las células J2N-3 anexina-V-positivas ni la lisis de las células J2N-3, aún a las mayores concentraciones usadas. Las Tablas 16D y 16E resumen respectivamente los porcentajes de células J2N-3 anexina-V-positivas y los porcentajes de lisis de las células J2N-3 inducidas por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3.

40 **Tabla 16D.** Muerte redirigida por parte de las células T a las células J2N-3 con baja expresión del BCMA inducidas por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3: porcentajes de células anexina-V positivas

**Experimento 1**

Células JJN-3 anexina-V positivas (%)	Concentración del TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10.000	1.000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	16,78	10,21	9,12	11,11	11,36	8,14	9,6
Control-TCB	8,84	/	/	/	/	/	/

Experimento 2							
Células JJN-3 anexina-V positivas (%)	Concentración del TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10.000	1.000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	22,86	17,53	16,5	15,94	14,32	13,07	10,74
Control-TCB	12,82	/	/	/	/	/	/

**Tabla 16E.** Muerte redirigida por parte de las células T a las células JJN-3 con baja expresión del BCMA inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3: porcentajes de lisis de las células JJN-3

Experimento 1							
Lisis de células JJN-3 (%)	Concentración del TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10.000	1.000	100	10	1	0,1	0
83A10-TCBcv	70,30	26,66	18,43	41,88	24,42	-14,45	0,00
Control-TCB	-6,55	/	/	/	/	/	/
Experimento 2							
Lisis de células JJN-3 (%)	Concentración del TCB anti-BCMA/anti-CD3 (pM)						
	10.000	1.000	100	10	1	0,1	0

83A10-TCBcv	51,18	25,30	20,12	39,58	-1,88	22,28	0,00
Control-TCB	4,18	/	/	/	/	/	/

**Ejemplo 20: Comparación de los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T que contienen al anticuerpo anti-BCMA que no bloquea/no compite con APRIL vs. el anticuerpo anti-BCMA que bloquea/compite con APRIL en la muerte redirigida por parte de las células T a las líneas celulares de mieloma múltiple BCMA-positivas en presencia de altas concentraciones de ligando**

En ciertos tumores malignos, tales como el mieloma múltiple, el nivel en circulación de los ligandos de BCMA, APRIL y BAFF pueden estar elevados (Moreaux et al. 2004; Blood 103(8): 3148-3157). Por consiguiente, los inventores reconocen que altos niveles de ligandos en el suero pueden interferir con la unión de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 al receptor BCMA presente en la superficie de las células tumorales. En comparación con los donantes sanos, los niveles en circulación de APRIL (ligando de BCMA de alta afinidad) en sangre en los pacientes con mieloma múltiple son ~100 ng/mL vs. ~10 ng/mL. Para BAFF (ligando de BCMA de baja afinidad), los niveles pueden fluctuar de 1-1.000 ng/mL en comparación con ~3 ng/mL en los donantes sanos. Cerca de las células tumorales, es decir, en el microambiente de la médula ósea de los pacientes con mieloma múltiple (la médula ósea es un órgano constitutivamente rico en APRIL), las concentraciones de APRIL/BAFF bien pueden ser mayores que los niveles medidos en el suero. Más importante, APRIL se expresa constitutivamente en el microambiente de la médula ósea, por lo cual es un importante factor de supervivencia para las células malignas de mieloma, y es también producido y secretado por las células precursoras mieloides de la médula ósea (Matthes et al. Blood 2011; 118 (7): 1838-1844). Por consiguiente, las concentraciones de APRIL en la médula ósea de los pacientes con mieloma, que se espera sean de mayor magnitud, hasta 1.000 ng/mL o más, son de gran relevancia en este contexto. En ciertas enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico, los niveles circulantes de APRIL también están elevados con ~ 85 ng/mL (Koyama et al. 2005; Ann Rheum Dis 64: 1065-1067).

Para verificar si los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 que no bloquean/compiten con APRIL serían más ventajosos que los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 que bloquean/compiten con APRIL, se analizó el potencial de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 que no bloquean/no compiten con APRIL, de inducir la muerte redirigida por parte de las células T a las células de mieloma que expresan BCMA tras el entrecruzamiento de la construcción vía la unión de los motivos de unión al antígeno al BCMA sobre la superficie de las células en presencia de las concentraciones elevadas de APRIL halladas en los pacientes con mieloma múltiple (es decir, 100 ng/mL a 1.000 ng/mL). Dado que APRIL se une al BCMA humano con una afinidad de hasta 1.000 veces mayor que con la que se une BAFF al receptor, las altas concentraciones de APRIL son más relevantes en este contexto que las de BAFF. Los altos niveles de APRIL más probablemente influenciarían la eficacia de los anticuerpos TCB, especialmente cuando la terapéutica se administra en muy bajas dosis a los (Bargou et al. Science 2008; 321 (5891); 974-7). Por consiguiente, se llevaron a cabo los siguientes experimentos en presencia de APRIL.

Brevemente, se cosecharon células blanco humanas de mieloma múltiple BCMA-positivas con un buffer de disociación, se lavaron y resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Aproximadamente, se plaquearon 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo redondeado y se añadió la respectiva dilución de las construcciones de TCB para una concentración final deseada (por triplicado); las concentraciones finales de los TCB anti-BCMA/anti-CD3 estaban dentro del rango de 0,1 pM a 10 nM, en presencia o en ausencia de APRIL a una concentración final de 100 ng/mL o 1.000 ng/mL. Para una comparación adecuada, todas las construcciones de TCB y los controles se ajustaron a la misma molaridad. Se añadieron las PBMC humanas (efectoras) en los pocillos para obtener una relación E:T final de 10:1. Los grupos correspondientes al control negativo presentaron solamente las células efectoras o blanco. Como control positivo para la activación de todas las células T humanas, se usó 1 µg/ml de PHA (Sigma #L8902). Para la normalización, se determinó la lisis máxima de las células blanco de MM H929 (= 100%) mediante la incubación de dichas células blanco con una concentración final de 1% Tritón X-100, induciendo así la muerte celular. La lisis mínima (= 0%) se representó por las células blanco co-incubadas con solamente las células efectoras, es decir, sin ningún anticuerpo biespecífico para células T. Luego de 24 h de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se midió la liberación de la LDH de las células blanco de mieloma H929 apoptóticas/necróticas en los sobrenadantes celulares utilizando el equipo comercial LDH detection kit (Roche Applied Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de liberación de



la LDH se graficó en función de las concentraciones de los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 T en una curva dosis-respuesta. Los valores de EC50 se midieron usando el programa Prism software (GraphPad) y se determinaron como la concentración de anticuerpo TCB que resulta en el 50% de la liberación máxima de la LDH. Como se muestra en la Figura 19, los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 inducen la muerte de las células de mieloma H929 BCMA-positivas en presencia o en ausencia de APRIL exógena. Como se observa en la Figura 19A, los anticuerpos 83A10-TCBcv que no bloquean/no compiten con APRIL indujeron de una manera dependiente de la concentración la muerte de las células de mieloma BCMA-positivas a una potencia baja en el orden de los picomolares ( $EC_{50}^{APRIL0} = 1,5 \text{ pM}$ ) en ausencia de APRIL exógena. Cuando se añadieron al cultivo 100 ng/mL de APRIL, una concentración de APRIL que puede hallarse en la sangre de los pacientes con mieloma múltiple, tal concentración de ligando mínimamente afectó la potencia de muerte mediada por los anticuerpos 83A10-TCBcv, como se reflejó con un aumento de 2,9 veces en el EC50 ( $EC_{50}^{APRIL100} = 4,3 \text{ pM}$ ). Cuando se añadió al cultivo una concentración 10 veces mayor de APRIL (es decir, 1.000 ng/mL), que puede ser hallada en la médula ósea de los pacientes con mieloma múltiple, la potencia de muerte mediada por los anticuerpos 83A10-TCBcv fue ligeramente disminuida, como se reflejó con un aumento de 6 veces en el EC50 ( $EC_{50}^{APRIL1000} = 9,0 \text{ pM}$ ). A pesar de esta pequeña disminución en la potencia de muerte en presencia de 1.000 ng/mL de APRIL, los anticuerpos 83A10-TCBcv que no bloquean/no compiten con APRIL todavía pudieron eficientemente matar a las células de mieloma H929 BCMA-positivas en el orden bajo de los picomolares. La Tabla 17 resume los valores de EC50 de los anticuerpos 83A10-TCBcv que no bloquean/no compiten con APRIL en ausencia y en presencia de APRIL.

**Tabla 17:** Valores de EC50 de la muerte dirigida por parte de las células T a las células H929 inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 que no bloquean/ no compiten con APRIL

Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)	Cantidad de veces aumento de
83A10-TCBcv (APRIL no exógena)	1,5	-
83A10-TCBcv con 100 ng/mL APRIL	4,3	2,9x
83A10-TCBcv con 1.000 ng/mL APRIL	9,0	6x

Como se observa en la Figura 19B, los anticuerpos J6M0-TCB que bloquean/compiten con APRIL indujeron de una manera dependiente de la concentración la muerte de las células de mieloma H929 BCMA-positivas con una potencia picomolar baja ( $EC_{50}^{APRIL0} = 5,8 \text{ pM}$ ) en ausencia de APRIL exógena. Cuando se añadieron al cultivo 100 ng/mL de APRIL, dicha concentración de ligando afectó mínimamente la potencia de muerte mediada por J6M0-TCB, tal como se muestra con un incremento de 2,4 veces en el valor de EC50 ( $EC_{50}^{APRIL100} = 14,2 \text{ pM}$ ). Sin embargo, cuando se añadieron al cultivo 1.000 ng/mL de APRIL la potencia de muerte mediada por J6M0-TCB disminuyó significativamente reflejándose como un aumento de 84,3 veces el valor del EC50 ( $EC_{50}^{APRIL1000} = 488,9 \text{ pM}$ ). La Tabla 18 resume los valores de EC50 de los anticuerpos que bloquean/compiten con APRIL, J6M0-TCB, en ausencia y en presencia de APRIL exógena.

Los resultados globales sugieren que los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 que no bloquean/no compiten con APRIL podrían tener una clara ventaja sobre los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 que bloquean/compiten con APRIL al no ser y/o ser menos influenciados por las altas concentraciones de APRIL que bien podrían estar presentes en el microambiente de la médula ósea de los pacientes con mieloma múltiple. A pesar de esta pequeña disminución en la potencia de muerte en presencia de 1.000 ng/mL de APRIL, los anticuerpos 83A10-TCBcv que no bloquean/no compiten con APRIL aún pudieron eficientemente matar las células de mieloma H929 BCMA-positivas con una potencia baja en el orden de los picomolares. La traducción de estas observaciones a nivel clínico significa que a una baja dosis terapéutica de un TCB como el 83A10-TCBcv en pacientes con altos niveles de APRIL en la médula ósea, todavía las células de mieloma pueden matarse. La situación podría ser diferente si se usa un TCB como J6M0-TCB; el efecto antitumoral en pacientes con altos niveles de APRIL bien podría perderse. Una

alternativa sería usar una dosis terapéutica mucho mayor, pero el riesgo de padecer efectos colaterales aumenta (para el TCB blinatumomab, se documentaron efectos colaterales dosis-dependiente).

**Tabla 18:** Valores de EC50 de la muerte redirigida por parte de las células T a las células H929 inducida por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 que bloquean/compiten con APRIL

Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (pM)	Cantidad de veces de aumento
J6M0-TCB (APRIL no exógena)	5,8	-
J6M0-TCB con 100 ng/mL APRIL	14,2	2,4x
J6M0-TCB con 1.000 ng/mL APRIL	488,9	84,3x

5

**Ejemplo 21: La variante sin carga del 83A10-TCB y la variante con carga del 83A10-TCBcv muestran propiedades biológicas similares**

Es esperable que un anticuerpo TCB con modificaciones en la carga en la CL-CH1 se comportase de manera similar en los ensayos basados en células, y que presente propiedades biológicas similares a las de su contraparte TCB salvaje sin modificaciones en la carga, dado que las CDR de la VL y VH permanecen idénticas en ambas moléculas.

10

Una de las propiedades biológicas más relevantes para comparar el TCB con la variante de carga vs. el TCB sin la variante de carga sería la capacidad de los anticuerpos TCB de unirse a las células. La Figura 20A muestra la unión del 83A10-TCB y del 83A10-TCBcv a las células H929 BCMA-positivas de una manera dependiente de la concentración y con una potencia similar, respectivamente EC50= 9,8 nM vs. EC50= 14,5 nM. El anticuerpo control DP47-TCB no se unió a las células de mieloma H929 BCMA-positivas, evidenciándose esto como una falta de aumento de la intensidad media de la fluorescencia. En un segundo experimento comparativo, se evaluó la capacidad de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv de unirse a las células H929 BCMA-positivas y de no unirse a las células MKN45 BCMA/CD3-negativas. Como se observa en la Figura 20B, el anticuerpo 83A10-TCB y el anticuerpo 83A10-TCBcv se unen a las células H929 BCMA-positivas de una manera dependiente de la concentración y con una potencia similar, respectivamente EC50=16,9 nM y EC50=14,5 nM. Los valores de EC50 de unión de los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv a las células H929 de ambos experimentos se resumen en la Tabla 19.

15

20

**Tabla 19:** Valores de EC50 de unión del anticuerpo 83A10-TCB y del anticuerpo 83A10-TCBcv a las células H929 (Experimentos 1 y 2).

Experimento 1		
Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3	EC50 (nM)	EC50 (µg/ml)
83A10-TCB	9,8	1,9

83A10-TCBcv	14,5	2,8
-------------	------	-----

<b>Experimento 2</b>		
<b>Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3</b>	<b>EC50 (nM)</b>	<b>EC50 (µg/ml)</b>
83A10-TCB	16,9	3,25
83A10-TCBcv	14,5	2,8

Otra propiedad biológica relevante para comparar los anticuerpos TCB con la variante de carga vs. los anticuerpos TCB sin la variante de carga sería su capacidad de inducir la muerte redirigida por parte de las células T a las células blanco. Como se observa en la Figura 20C-F, los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 ((C, D) 83A10-TCB, (E, F) 83A10-TCBcv) inducen de una manera dependiente de la concentración la muerte de las células de mieloma H929 BCMA-positivas, tal como se midió mediante la liberación de la LDH. La muerte de las células H929 resultó ser específica dado que el anticuerpo control DP47-TCB que no se une a las células blanco BCMA-positivas no indujeron la liberación de la LDH, aún a la mayor concentración de 1 nM (C). A pesar de que los valores de EC50 no fueron medibles por el programa Prism (GraphPad) statistical software para el 83A10-TCB (C, D) y el 83A10-TCBcv (E, Experimento 1), la magnitud de los valores de EC50 pudieron ser estimados aproximadamente en un rango de potencia bajo en el orden de los picomolares para ambas moléculas -cargada y no cargada- de TCB. En un segundo experimento, el efecto del 83A10-TCBcv se evaluó en el ensayo de muerte redirigida de las células T y se pudo medir un valor de EC50 como 1,5 pM (F). Los autores no pudieron excluir que el valor ligeramente bajo de EC50 (potencia ligeramente mejor) pudiera ser por la variabilidad de los donantes de sangre. Sin embargo, la magnitud de la potencia para matar a las células H929 fue definitivamente en el bajo orden de los picomolares. Los resultados globales sugieren que el 83A10-TCB (sin la variante de carga) vs. 83A10-TCBcv (con la variante de carga) presentan propiedades biológicas similares en los ensayos basados en células. Los valores de EC50 de la muerte redirigida por parte de las células T a las células H929 inducida por el 83A10-TCB y el 83A10-TCBcv se resumen en la Tabla 20.

**Tabla 20:** Valores y estimaciones de EC50 para la muerte redirigida por parte de las células T a las células H929 inducida por los anticuerpos 83A10-TCB y 83A10-TCBcv

<b>Moléculas TCB anti-BCMA/anti-CD3</b>	<b>EC50 (pM)</b>	<b>EC50 (µg/ml)</b>
83A10-TCB (Experimento 1)	Bajo orden de pM (aprox. <20)	Un solo dígito
83A10-TCB (Experimento 2)	Bajo orden de pM (aprox. <20)	Un solo dígito
83A10-TCBcv (Experimento 1)	Bajo orden de pM (aprox. <20)	Un solo dígito

83A10-TCBcv (Experimento 2)	1,5	0,3
-----------------------------	-----	-----

**Ejemplo 22: Expresión del BCMA en la superficie de las células de mieloma de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple**

5 Las líneas celulares humanas que expresan el blanco tumoral de interés son de mucha utilidad y son consideradas herramientas prácticas para la medición de la potencia del anticuerpo TCB para inducir la citotoxicidad de la célula tumoral en presencia de células T y para la determinación de los valores de EC50 y para la clasificación de las moléculas de TCB. Sin embargo, a pesar de que las líneas celulares humanas de mieloma son actualmente de fácil acceso y prácticas, tienen la salvedad de que no representan la heterogeneidad del mieloma múltiple, una enfermedad muy compleja que se caracteriza porque existe a nivel molecular una significativa heterogeneidad. 10 Además, las líneas celulares de mieloma no expresan el receptor BCMA con la misma intensidad y densidad dado que algunas células expresan el BCMA más fuertemente que otras (por ej., las células H929 vs. las células U266 o RPMI-8226), lo cual sugiere que dicha heterogeneidad a nivel celular también se observa entre los diferentes pacientes. A través de las colaboraciones académicas con señales en el tema mieloma múltiple se está investigando la determinación de la expresión y la densidad del BCMA en las muestras de clínicas de pacientes. Se recolectaron 15 muestras de sangre y aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple luego de firmar el consentimiento informado de acuerdo con las guías locales del comité de ética y la Declaración de Helsinki.

**a) Expresión del BCMA detectada mediante citometría de flujo (intensidad media de fluorescencia)**

20 Para determinar la expresión del receptor BCMA en la superficie de las células de mieloma de la médula ósea, se realizaron análisis inmunofenotípicos utilizando aspirados frescos de médula ósea. Para el análisis inmunofenotípico se usaron muestras de médula ósea entera anticoaguladas con K<sub>3</sub>-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y con los eritrocitos lisados. Un total de  $2 \times 10^6$  células por tubo se tiñeron, lisaron, y luego lavaron usando una técnica de inmunofluorescencia directa con una tinción multicolor, con el objetivo de identificar específicamente y caracterizar el inmunofenotipo de las células plasmáticas malignas identificadas como CD138<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>. Luego, las células se tiñeron usando un panel de anticuerpos conjugados con fluorocromos en los que se incluyen al menos 25 CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC. Los anticuerpos marcados con fluorocromo se adquirieron en BD Biosciences (San Jose, CA) y Caltag Laboratories (San Francisco CA). El anticuerpo anti-BCMA humana conjugado con APC casero se usó en los análisis inmunofenotípicos. La adquisición se realizó usando un citómetro de flujo multicolor con su programa instalado (por e j., Cantoll device running FACS Diva software o con el citómetro de flujo FACSCalibur usando el programa CellQUEST software). El programa Paint-A-Gate PRO (BD Biosciences) se usó para el análisis de los datos. La expresión del BCMA se midió dentro de la población de células 30 plasmáticas malignas y los valores de intensidad media de fluorescencia se determinaron y compararon entre los pacientes con mieloma.

**Tabla 21.** Expresión del BCMA en las células plasmáticas de mieloma de la médula ósea de pacientes detectada por citometría de flujo multiparametral (intensidad media de fluorescencia)

Paciente N°	MFI <sub>BCMA</sub>
P1	2.863
P2	3.528
P3	602

P4	389
P5	955
P6	1.475
P7	282
P8	1.621
P9	116
P10	125
P11	1.495
P12	2.451
P13	398
P14	2.040
P15	678
P16	945
P17	1.672
P18	1.491
P19	2.198
P20	1.058
P21	3.594
P22	615
P23	159

**b) Determinación del número de copias del antígeno BCMA (análisis cuantitativo por citometría de flujo)**

- (i) El método Qifikit (Dako) se utiliza para cuantificar el número de copias del antígeno BCMA en la superficie celular de las células H929. Las células H929 se lavaron una vez con el buffer FACS (100 µl/pocillo; 350 x g por 5 min) y se ajustan a 1 millón de células/ml. Se transfirieron 50 µl (= 0,5 millones de células) de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo redondo, como se indica. Luego, se añadieron 50 µl de IgG de ratón anti-BCMA humana (BioLegend #357502) o un IgG2a de ratón (BioLegend # 401501) como control de isotipo diluidos en buffer FACS (PBS, 0.1% BSA) a una concentración final de 25µg/ml (o concentraciones saturadas) y la tinción se llevó a cabo durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Luego, se añadieron 100 µl de las perlas Set-up o de calibración en pocillos separados y las células, y las perlas se lavaron dos veces con el buffer FACS. Las células y las perlas se resuspendieron en 25 µl del buffer FACS, que contiene un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína (a concentraciones saturadas), proporcionado en el equipo comercial Qifikit. Las células y las perlas se tiñeron durante 45 min a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron una vez y las muestras se resuspendieron en 100 µl del buffer FACS. Las muestras se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo multicolor y con su programa instalado (por e j., Cantoll device running FACS Diva software o con el citómetro de flujo FACSCalibur usando el programa CellQUEST software). Alternativamente, en algunos estudios, en vez de usar el anticuerpo comercial IgG de ratón anti-BCMA humana como anticuerpo primario, se usan anticuerpos IgG anti-BCMA humana caseros que poseen una capacidad de unión óptima (por ej., 83A10 IgG, 17A5-IgG o 13A4), seguido de un paso adicional de incubación con un primer anticuerpo secundario comercial no conjugado contra IgG-Fc humana (Abcam, Cat no. ABM121) antes del paso de incubación de las perlas de calibración con las células en presencia del buffer FACS que contiene al segundo anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína. Cuando los anticuerpos primarios y secundarios se usan a concentraciones saturadas, el número de moléculas de anticuerpo primario unidas se corresponde con el número de sitios antigénicos presente en la superficie celular y la fluorescencia se correlaciona con el número de moléculas de anticuerpo primario unidas en las células y en las perlas.
- (ii) El método Qifikit (Dako) se utiliza para cuantificar la capacidad de unión al antígeno específico (SABC) BCMA en la superficie celular de las células plasmáticas de mieloma de la médula ósea de pacientes. Las células plasmáticas de mieloma aisladas de los aspirados de médula ósea se tiñeron con 50 µl de IgG de ratón anti-BCMA humana (BioLegend #357502) o con IgG2a de ratón (BioLegend # 401501) como control de isotipo diluidos en buffer FACS (PBS, 0.1% BSA) a una concentración final de 25µg/ml (o concentraciones saturadas) y la tinción se llevó a cabo durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Luego, se añadieron 100 µl de las perlas Set-up o de calibración en pocillos separados y las células, y las perlas se lavaron dos veces con el buffer FACS. Las células y las perlas se resuspendieron en 25 µl del buffer FACS, que contiene un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluoresceína (a concentraciones saturadas), proporcionado en el equipo comercial Qifikit. Las células y las perlas se tiñeron durante 45 min a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron una vez y las muestras se resuspendieron en 100 µl del buffer FACS. Las muestras se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo multicolor y con su programa instalado (por e j., Cantoll device running FACS Diva software o con el citómetro de flujo FACSCalibur usando el programa CellQUEST software).

**Tabla 22.** Capacidad de unión al antígeno específico BCMA en las células plasmáticas de mieloma de médula ósea de pacientes medida mediante un análisis cuantitativo con el citómetro de flujo.

Paciente Nº	SABC <sub>BCMA</sub>
P1	n/a
P2	n/a
P3	679
P4	145

P5	957
P6	969
P7	554
P8	4.479
P9	350
P10	414
P11	2.756
P12	2.911
P13	1.267
P14	3.453
P15	1.006
P16	1.097
P17	1.622
P18	429
P19	1.684
P20	383
P21	1.602
P22	799
P23	204

**Ejemplo 23: Citotoxicidad redirigida por parte de las células T a las células de mieloma de la médula ósea de pacientes inducida con los anticuerpos biespecíficos de células T anti-BCMA/anti-CD3 (citometría de flujo)**

5 a) Una de las caracterizaciones in vitro más significativas y críticas durante la evaluación pre-clínica de los anticuerpos TCB candidatos para el tratamiento del mieloma múltiple es si la molécula TCB es capaz de activar las células T de pacientes e inducir la muerte mediada por células T redirigida a las células primarias de mieloma de la médula ósea de un paciente. Para evaluar el efecto de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 de inducir la muerte mediada por células T redirigida a las células de mieloma de la médula ósea, se recolectaron y prepararon células T autólogas sanguíneas aisladas a partir de sangre entera y muestras de médula ósea entera con los eritrocitos lisados. En una primera aproximación experimental, las células T autólogas infiltradas en la médula ósea se usaron como células efectoras y los anticuerpos TCB se pipetearon directamente en las muestras de médula ósea entera con los eritrocitos lisados. Se determinó y midió por citometría de flujo la relación de las células efectoras con respecto a las células tumorales (relación E:T) en las muestras de médula ósea entera. Preferentemente, se usó una relación E:T de 1-3 células CD3<sup>+</sup> por cada 1 célula de mieloma. En una segunda aproximación experimental, las células T autólogas sanguíneas aisladas a partir de sangre entera se añadieron a la muestra de médula ósea entera para obtener una relación E:T de 1-3 células CD3<sup>+</sup> por cada 1 célula de mieloma. Brevemente, se transfirieron 200 µl de la muestra de médula ósea entera con los eritrocitos lisados en placas de 96 pocillos. Se prepararon diluciones del anticuerpo anti-BCMA/anti-CD3 y del anticuerpo control en PBS estéril y 10 µl de la preparación se añadieron a los respectivos pocillos para alcanzar una concentración final en el rango de 0.1 pM a 100 nM. La suspensión médula ósea-anticuerpo se mezcló mediante agitación suave y se incubó a 37 °C, 5 % CO2 durante 48 h, sellada con film de parafina. Luego del período de incubación, 20 µl de una solución de anticuerpos para FACS preparada en base al panel de anticuerpos que incluye CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC/Anexina-V-PerCP-Cy5.5 se añadió a la placa de 96 pocillos con fondo en U. Los anticuerpos marcados con fluorocromos se adquirieron en BD Biosciences (San Jose, CA) y Caltag Laboratories (San Francisco CA) y se usó un anticuerpo anti-BCMA humano conjugado con APC casero. Las muestras se incubaron luego durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente y se adquirieron y analizaron con un citómetro de flujo multicolor. La muerte celular de las células de mieloma se determinó mediante la evaluación de la expresión positiva de anexina-V seleccionada de la población de células de mieloma CD138<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> y CD138<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>BCMA<sup>+</sup>. Luego se determinaron los porcentajes de muerte celular de las células de mieloma.

30 Para evaluar si los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 inducen la activación de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>T de un paciente con mieloma (por ej., células T infiltradas en médula ósea (MILS) y células T sanguíneas), las muestras de los respectivos grupos tratados, no tratados y control fueron también teñidos con una solución de anticuerpos para FACS preparada en base a un panel de anticuerpos que incluyen CD8-APCH7/CD69-FITC/CD107-BV510/CD16-PE/CD25-PerCP-Cy7/CD4-PacB/HLD-DR-APC/CD3-PerCP-Cy5.5. Las muestras se incubaron luego durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se adquirieron y analizaron usando un citómetro de flujo multicolor. La activación de las células T se determinó mediante la evaluación de la expresión positiva del CD25 y/o CD69 seleccionada de la población de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Luego se midieron los porcentajes de activación de las células T.

40 b) Para evaluar el efecto de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 de inducir la muerte redirigida por parte de las células T a las células plasmáticas de mieloma de médula ósea, se recolectaron aspirados de médula ósea entera de pacientes con mieloma múltiple en tubos recubiertos con EDTA e inmediatamente se usaron para los ensayos en cultivos celulares. Se determinó y midió por citometría de flujo la relación de las células efectoras con respecto a las células tumorales (relación E:T) en las muestras de médula ósea enteras. Brevemente, se transfirieron 200 µl de las muestras de médula ósea a placas de 96 pocillos. Se prepararon diluciones del anticuerpo TCB anti-BCMA/anti-CD3 y del anticuerpo control en medio estéril y 10 µl de la preparación se añadió a los respectivos pocillos para alcanzar concentraciones finales dentro del rango de 0,1 pM a 30 nM. La suspensión médula ósea-anticuerpo se mezcló mediante agitación suave y se incubó a 37 °C, 5 % CO2 durante 48 h, sellada con film de parafina. Luego del período de incubación, 20 µl de una solución de anticuerpos para FACS preparada en base al panel de anticuerpos que incluye CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC/Anexina-V-PerCP-Cy5.5 se añadió a la placa de 96 pocillos con fondo en U. Los anticuerpos marcados con fluorocromos se adquirieron en BD Biosciences (San Jose, CA) y Caltag Laboratories (San Francisco CA) y se usó un anticuerpo anti-BCMA humano conjugado con APC casero. Las muestras se incubaron luego durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente y se adquirieron y analizaron con un citómetro de flujo multicolor. La muerte celular de las células de mieloma se determinó mediante la evaluación de la expresión positiva de anexina-V seleccionada de la población de células de mieloma CD138<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>. El porcentaje de células de mieloma muertas fue posteriormente determinado. El porcentaje de lisis de las células plasmáticas de mieloma de la médula ósea de pacientes inducido por una concentración específica del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 también se determinó al medir el recuento absoluto de las células plasmáticas de mieloma anexina-V-negativas en presencia de una determinada concentración del TCB y restando dicho valor del recuento absoluto de las células plasmáticas de mieloma anexina-V-negativas en ausencia del TCB; dividido por el recuento



absoluto de las células plasmáticas de mieloma anexina-V-negativas en ausencia del TCB. Para verificar la especificidad de los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T, también se midió la expresión de anexina V en otros tipos celulares presentes en la médula ósea tales como células T, células B, y células NK. Como se observa en la Figura 21, se produjo una lisis específica y dependiente de la concentración de las células plasmáticas de mieloma de pacientes, mientras que no se observó lisis de células T, células B ni células NK. Además, el control-TCB que se une únicamente al CD3 y no al BCMA no indujo la muerte celular de las células plasmáticas de mieloma a la mayor concentración de anticuerpos TCB. Como se observa en la Tabla 23, el porcentaje de células de mieloma de médula ósea de pacientes anexina-V positivas a la mayor concentración (30 nM) alcanzó hasta un 29,31% para el 83A10-TCBcv, lo cual sugiere que el 83A10-TCBcv es potente para inducir la muerte de las células plasmáticas de mieloma de la médula ósea de pacientes.

**Tabla 23.** Porcentaje de células plasmáticas de mieloma anexina-V positivas provenientes de médula ósea de pacientes inducidas por los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T.

Células plasmáticas de mieloma Anexina-V positivas (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30.000	10.000	1.000	100	10	0
83A10-TCBcv	29,31	30,95	23,14	15,74	16,76	13,11

c) En otro estudio, en los aspirados de médula ósea provenientes de 3 pacientes con MM, el porcentaje de células plasmáticas de mieloma viables se determinó mediante la selección de la población de células anexina-V-negativas y se graficó en función de la concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3. Se midieron los valores de EC50, los cuales se determinaron como la concentración del anticuerpo TCB que resulta en un máximo del 50% de células plasmáticas de mieloma viables. El EMAX (%) se determinó como el porcentaje máximo de células plasmáticas de mieloma viables en presencia del respectivo anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3. El 83A10-TCBcv resultó ser potente para inducir la lisis de las células plasmáticas de mieloma en la médula ósea de los aspirados de pacientes (Tabla 24; Figura 22). Se observó una disminución dependiente de la concentración de las células de mieloma viables en 3/3 muestras de pacientes tratados con el 83A10-TCBcv. La Figura 22 y la Tabla 24 también muestran la comparación del 83A10-TCBcv con el J6M0-TCBcv (J6M0 es un anticuerpo que se documentó que compite con APRIL por la unión con BCMA (Tai et al., Blood 2014) con respecto a los valores de EC50 y EMAX (%), realizados en un estudio subsiguiente. En 3/3 muestras de pacientes, el 83A10-TCBcv indujo una mayor lisis de las células plasmáticas de mieloma provenientes de aspirados de médula ósea de pacientes que el J6M0-TCBcv a una dosis equimolar máxima de 30 nM como se refleja con los valores de EMAX, valores que representan el porcentaje de células plasmáticas de mieloma viables (a menor porcentaje, mayor el porcentaje de células lisadas). Los valores de EC50 también indican que el 83A10-TCBcv fue también más potente que el J6M0-TCBcv en 2/3 muestras de pacientes.

**Tabla 24.** Valores de EC50 (nM) y EMAX (%) con respecto a las células plasmáticas de mieloma anexina-V-negativas provenientes de los aspirados de médula ósea de pacientes inducidas por los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T.

Muestras de aspirados de médula ósea de pacientes	83A10-TCBcv		J6M0-TCBcv	
	EC50 (nM)	EMAX (%)	EC50 (nM)	EMAX (%)
Paciente 001	1,0	0,62	1,0	4,43

Paciente 002	8,24	55,5	1,0	63,6
Paciente 003	8,02	56,0	9,5	87,5

d) En estudios adicionales de los nuevos anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T de esta invención en comparación con 83A10-TCBcv, siete muestras/aspirados frescos de médula ósea de paciente se tiñeron con las microperlas magnéticas para CD138 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), se pasaron a través de una columna de separación celular autoMACS y se recolectaron las fracciones con el número suficiente de células plasmáticas de MM remanentes, usualmente >4% de las células plasmáticas de mieloma, las cuales se usaron para otros experimentos. En placas de 24 pocillos, se incubaron y cultivaron durante 48 horas 500.000 células por pocillo. Se añadieron diluciones de los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 y del anticuerpo control a los pocillos respectivos para una concentración final de TCB de 0,1 pM a 10 nM. Cada punto de dosis se realizó por triplicado. Se investigó la viabilidad de las células plasmáticas y de las células del microambiente de la médula ósea mediante una tinción doble con yoduro de propidio/CD138-FITC usando citómetro de flujo (FACSCalibur; Becton Dickinson). El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FACSDiva Software (Becton Dickinson). Como se muestra en la Figura 23, las barras indican los valores promedio normalizados sobre el promedio de los triplicados del respectivo control del medio (MC). Para el análisis estadístico, se usó un estadístico t para la prueba de una cola. La máxima inhibición del crecimiento de las células plasmáticas de MM a una concentración 10 nM (IMAX10) y la inhibición medida a 1nM (IMAX1), respectivamente, se expresaron como porcentaje y se refirieron al control del medio. La máxima inhibición del anticuerpo control-TCB (10 nM) comparada con el control del medio también fue descrita. Los cálculos se realizaron utilizando R 3.1.19, y Bioconductor 2.1310, pero para el cálculo de los valores de IMAX (Microsoft Excel®; Microsoft Office Professional 2013). Se considera un efecto estadísticamente significativo si el P-valor de su correspondiente test estadístico era <5% (\*), < 1% (\*\*) o <0,1% (\*\*\*). Como se muestra en las Figuras 23A-23G, los resultados claramente demuestran que había menos células plasmáticas de mieloma de médula ósea viable con el 83A10-TCBcv (es decir, más lisis de las células plasmáticas de mieloma de médula ósea) en 7/7 muestras de pacientes en comparación con el control del medio. La Tabla 25 demuestra el porcentaje de células plasmáticas de mieloma viables provenientes de aspirados de la médula ósea de un paciente inducidas por los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T en relación con el control del medio. La Tabla 26 muestra los valores de IMAX10 e IMAX1. Los resultados demuestran que el 83A10-TCBcv es potente para inducir la muerte de las células plasmáticas de mieloma de la médula ósea de un paciente. A pesar de la lisis específica de las células plasmáticas de médula ósea (BMPC) inducida por los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T y observada en todas las muestras de médula ósea de pacientes, el microambiente de la médula ósea (BMME) no se vio afectado en las respectivas muestras (Figura 23H, representativa de las 7 muestras de pacientes).

**Tabla 25.** Porcentaje relativo de células plasmáticas de mieloma viables yoduro de propidio negativas provenientes de los aspirados de médula ósea inducidas por los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T.

Muestra de paciente No. 1 / Células plasmáticas de mieloma viables (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	181,3	106,3	31,3	9,4
Ctrl-TCB	/	/	/	162,5
Muestra de paciente No. 2 / Células plasmáticas de mieloma viables (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (nM)			

	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	89,5	31,6	5,3	0
Ctrl-TCB	/	/	/	94,7
<b>Muestra de paciente No. 3 / Células plasmáticas de mieloma viables (%)</b>	<b>Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (nM)</b>			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	76,7	35,0	1,7	0
Ctrl-TCB	/	/	/	86,7
<b>Muestra de paciente No. 4 / Células plasmáticas de mieloma viables (%)</b>	<b>Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (nM)</b>			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	93,9	51,5	9,1	6,1
Ctrl-TCB	/	/	/	127,3
<b>Muestra de paciente No. 5 / Células plasmáticas de mieloma viables (%)</b>	<b>Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (nM)</b>			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	100	91,4	62,9	20,0
Ctrl-TCB	/	/	/	85,7
<b>Muestra de paciente No. 6 / Células plasmáticas de mieloma viables (%)</b>	<b>Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (nM)</b>			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	55,6	22,2	6,7	4,4
Ctrl-TCB	/	/	/	117,8

Muestra de paciente No. 7 / Células plasmáticas de mieloma viables (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (nM)			
	0,01	0,1	1	10
83A10-TCBcv	84,4	82,6	46,8	19,3
Ctrl-TCB	/	/	/	106,4

5 **Tabla 26:** Valores de IMAX10 e IMAX1 con respecto a la inhibición máxima del crecimiento de las células plasmáticas de MM a 10 nM en IMAX10 y a 1nM en IMAX1 en base a las células plasmáticas de mieloma viables yoduro de propidio negativas provenientes de los aspirados de médula ósea de un paciente en presencia de los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T.

Muestra de Paciente No.	83A10-TCBcv		Ctrl-TCB
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	90,6	68,8	-62,5
3	100	94,7	5,3
4	100	98,3	13,3
5	93,9	90,9	-27,3
6	80,0	37,1	14,3
7	95,6	93,3	-17,8
8	80,7	53,2	-6,4

**Ejemplo 23A: Activación de las células T de médula ósea de un paciente, inducida por los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T (citometría de flujo de múltiples parámetros)**

10 Para evaluar si los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3 inducen la activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de un paciente con mieloma (es decir, células T infiltradas en médula ósea (MILs)), las muestras de los respectivos grupos, tratados, no tratados y control luego de 48 h de incubación fueron también teñidas con una solución de anticuerpos para FACS preparada basada en un panel de anticuerpos que incluyen 8 marcadores: CD8/CD69/TIM-3/CD16/CD25/CD4/HLA-DR/PD-1. Las muestras fueron luego incubadas durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se adquirieron y analizaron utilizando un citómetro de flujo multicolor. La activación de las

5 células T se determinó mediante la evaluación de la expresión positiva de CD25, CD69 y/o HLA-DR de las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Luego, se midieron los porcentajes de activación de las células T. La Figura 24 muestra un aumento en la regulación de CD69 y CD25 de manera dependiente de la concentración en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> infiltradas en la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. La Tabla 26A resumen el aumento de la expresión de CD69 y CD25 en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> inducidas por los anticuerpos TCB anti-BCMA/anti-CD3; datos provenientes de un paciente.

**Tabla 26A:** Valores de EC50 para la activación de células T de células T autólogas de un paciente con mieloma inducida por los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T en presencia de células plasmáticas de mieloma de la médula ósea del paciente

Células T CD69+ / CD4 (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30.000	10.000	1.000	100	10	0
83A10-TCBcv	21,8	14,93	1,80	0,93	1,02	0,85
Control-TCB	0,7	0,62	/	/	/	/
Células T CD69+ / CD8 (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30.000	10.000	1.000	100	10	0
83A10-TCBcv	25,50	22,07	8,330	5,60	5,14	5,30
Control-TCB	5,71	4,93	/	/	/	/
Células T CD25+ / CD4 (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30.000	10.000	1.000	100	10	0
83A10-TCBcv	17,47	12,86	5,18	4,58	4,07	7,5
Control-TCB	6,90	6,50	/	/	/	/
Células T CD25+ / CD8 (%)	Concentración del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 (pM)					
	30.000	10.000	1.000	100	10	0
83A10-TCBcv	9,79	6,560	0,42	0,13	0,12	0,12

Control-TCB	0,09	0,100	/	/	/	/
-------------	------	-------	---	---	---	---

**Ejemplo 24: Estudio farmacocinético en ratones**

Una clara ventaja de un anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3 con respecto a otros anticuerpos biespecíficos, tales como (scFV)<sub>2</sub> (por ej. el anticuerpo biespecífico BCMAxCD3 de células T acoplado con BiTE como se describe en WO2013/072415 y WO2013/072406) podría ser la mayor vida media de eliminación/menor clearance in vivo lo que permitiría su administración por vía i.v. o s.c. dos veces o una vez por semana, en comparación con la vida media de eliminación muy corta del (scFV)<sub>2</sub> (por ej. 1 a 4 horas) lo cual hace que el tratamiento requiera ser administrado vía una bomba llevada por los pacientes durante semanas o meses (Topp et al. J Clin Oncol 2011; 29(18): 2493-8). La administración de dos veces o una vez por semana es mucho más conveniente para los pacientes y también es menos riesgoso (por ej., fallas en la bomba, problemas con el catéter).

Para verificar la vida media de eliminación /clearance del anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3 in vivo, ratones inmunodeficientes machos y/o hembras (por ej. ratones NOD/SCID o NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG), de 6-10 semanas de edad y de 18-25 g de peso se obtuvieron a través de reconocidos vendedores tales como Charles River, The Jackson Laboratory y/o Taconic y se los aclimatizó bajo las condiciones apropiadas por al menos una semana. Durante todo el período de aclimatación y el período experimental los animales tuvieron acceso a una dieta estándar en pellets y agua ad libitum. El alojamiento de los animales y todos los procedimientos se llevaron a cabo en CRO experimentados y/o laboratorios autorizados de acuerdo con las guías federales y las regulaciones del bienestar animal.

a) Para realizar los estudios farmacocinéticos, los animales se aleatorizaron en grupos de n=1 a n=6, preferentemente n=2 a n=4, asignados a tratamientos y/o dosis y/o intervalos de tiempo seleccionados para la recolección de la sangre. Los grupos se mantuvieron por separado en jaulas y los animales individuales se marcaron con métodos apropiados. A los animales se les administró por vía i.v. una dosis única del anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3 en un rango de dosis de 1 µg/kg a 20 mg/kg, preferentemente 5 µg/kg a 0,5 mg/kg. La administración de los volúmenes se realizó en un rango de 5 a 10 mL/kg. En algunos grupos, los ratones pueden recibir con fines comparativos dosis i.v. de un BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub>. Las extracciones de sangre se esquematizaron de acuerdo con el/los protocolo(s) experimental(es) en múltiples intervalos de tiempo antes y después de la administración en el rango de 10 min a 14 días posteriores a la inoculación IV del ítem a ensayar, preferentemente de 15 min a 168 horas. Las muestras de sangre de aproximadamente 200 µl se recolectaron usando capilares para hematocrito en microvettes® ya sea mediante punción del plexo venoso retrobulbar o, en el momento de la eutanasia, mediante punción cardíaca. Las muestras de sangre se guardaron a 4° C inmediatamente y se centrifugaron por 2-5 min a 9000 x g. Los sobrenadantes de suero o plasma de al menos 80 µl se separaron y guardaron en -20° C o -80° C hasta su posterior análisis. Las concentraciones de anticuerpo(s) en suero o plasma se midieron usando un ensayo de ELISA estándar para detectar IgG humano (abcam; Cat. # ab1000547). A partir de las concentraciones séricas y/o plasmáticas, se calcularon los parámetros farmacocinéticos, por ej., concentración máxima sérica/plasmática volumen de distribución, área bajo la curva de concentración en función del tiempo, clearance, tiempo promedio de residencia y/o tiempo de vida. Para la detección de las concentraciones séricas del BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> que le falta el Fc de la IgG humana, se utilizó un ensayo biológico para cuantificar las concentraciones sub-ng/ml del BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> en las muestras séricas de los ratones tratados. La base del ensayo biológico es la observación de que el BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> induce un aumento en la regulación de los marcadores de superficie de activación de células T (CD69 y/o CD25) en una manera concentración-dependiente, como fue previamente documentado (Schlereth et al. Cancer Immunol Immunother 2006; 55:503-514). Las concentraciones del BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> en el rango de 3 ng/ml a 200 pg/ml se usan para la generación de curva estándar para la medición de la respuesta inmunológica de las células T CD3-positivas en presencia del BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> unido a las células H929 BCMA-positivas. Las células se incubaron en una relación E:T de 10:1 a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> overnight. Las muestras blanco (sin BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub>) son utilizadas para medir el background de la expresión de los marcadores. Las muestras a ensayar se procesaron puras y diluidas 1:2 y 1:4 en un pool de sueros humanos de manera equivalente al procedimiento de los estándares. Los niveles de expresión de los marcadores inmunológicos de superficie se determinaron mediante un análisis por FACS utilizando los anticuerpos de detección anti-CD25 y/o anti-CD69 marcados con FITC o PE (BD biosciences). Las concentraciones de BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> de las muestras incógnitas se determinaron al graficar la cantidad del marcador respectivo en la curva de calibración estándar contra las concentraciones conocidas del BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> usando la función "valores interpolados de

X” del programa Prism Software (GraphPad). Se puede seguir con un estudio farmacocinético de la vía subcutánea en ratones dado que la administración por la vía subcutánea sería finalmente la vía de administración clínicamente preferida.

5 b) En un estudio farmacocinético de dosis única, los animales se aleatorizaron en 3 grupos de tratamiento de n=9  
 10 ratones por grupo, y luego fueron adicionalmente asignados a intervalos de tiempo seleccionados para la  
 recolección de la sangre (n=3 por intervalo de tiempo por grupo de tratamiento). A los animales se les administró una  
 dosis única por vía IV del anticuerpo anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv en un rango de dosis de 0,0082 mg/kg a  
 0,82 mg/kg. El volumen de administración fue de 5 mL/kg. Las extracciones de sangre se esquematizaron de  
 15 acuerdo con el protocolo experimental a múltiples intervalos de tiempo: 0,25; 0,5; 1; 3; 7; 24; 48; 96; 168; 240 h  
 posteriores a la inoculación i.v. del ítem a ensayar 83A10-TCBcv. Las muestras de sangre de aproximadamente 100  
 µl por animal se recolectaron usando capilares para hematocrito en microvettes® ya sea mediante punción del plexo  
 venoso retro bulbar (para un ratón individual, la sangre del plexo retro bulbar solo se recolectó en 2 o como máximo  
 3 intervalos de tiempo después de la inoculación) o, en el momento de la eutanasia, mediante punción cardíaca. Las  
 20 muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 min para permitir la  
 coagulación y se centrifugaron durante 2,5 min a 9.300g. Los sobrenadantes séricos de al menos 50 µl se  
 recolectaron y se transfirieron en tubos Eppendorf limpios de 200 µl y se guardaron entre -85°C a -70°C hasta su  
 posterior análisis. Las concentraciones séricas del 83A10-TCBcv en estudio se midieron usando ensayos  
 bioquímicos estándar para detector Fc humana o CH1/kappa humana como está descrito en Stubenrauch et al. J  
 Pharm Biomed Anal 2009 and Stubenrauch et al. J Pharm Biomed Anal 2013. Las concentraciones séricas  
 25 documentadas en la Tabla 27 y en la Figura 25 se midieron usando el ELISA para la detección del Fc. La Tabla 27 y  
 la Figura 25 muestran las concentraciones séricas medidas por ELISA con las 3 dosis. La Figura 25 sugiere una  
 linealidad de la dosis en el rango de dosificación estudiado. Las curvas de concentración en función del tiempo  
 parecen mostrar que en las primeras horas post-inoculación, una declinación relativamente más rápida que la  
 declinación de las concentraciones observadas en el período de tiempo entre las 24 y 240 horas post-inoculación. A  
 30 dosis medias (0,082 mg/kg) la declinación entre las 24 y 240 horas refleja un comportamiento bastante lineal y una  
 vida media de eliminación de aprox. 6 a 7 días se puede determinar mediante la pendiente de la declinación lineal.  
 La declinación en la curva de concentración en función del tiempo a altas dosis (0,82 mg/kg) parece ser aún más  
 lento, es decir, la vida media de eliminación es al menos 6 a 7 días pero puede ser todavía más prolongada. La vida  
 media de eliminación entre las 24 y 240 horas a bajas dosis (0,0082 mg/kg) no puede ser totalmente evaluada  
 porque los niveles séricos a las 240 horas están por debajo del límite de detección. Sin embargo, la Figura 25  
 sugiere que la vida media de eliminación entre las 24 y 96 horas puede ser menor que 6 a 7 días, posiblemente  
 cerca de 3 a 5 días. Las curvas de concentración en función del tiempo observadas para 83A10-TCBcv apoyan la  
 chance de que los intervalos de administración de la droga convenientes son de una vez o dos veces por semana.

35 **Tabla 27.** Concentraciones séricas del 83A10-TCBcv después de un único tratamiento IV en ratones; de acuerdo  
 con el protocolo del estudio a los distintos intervalos de tiempo de recolección, la sangre se recolectó del plexo  
 retrobulbar de 2, 3 o máximo 4 ratones diferentes. Por consiguiente, se muestran los valores de las concentraciones  
 promedio y sus SD medidos en 2, 3 o 4 muestras, respectivamente (BLQ, significa por debajo del nivel de  
 cuantificación).

Tiempo recolección tratamiento	Concentración del 83A10-TCBcv por grupos tratados		
	0,0082 mg/kg  (promedio ± SD)	0,082 mg/kg  (promedio ± SD)	0,82 mg/kg  (promedio ± SD)
15 min	125 ± 19	1.173 ± 260	15.521 ± 2.677
30 min	109 ± 12	1.321 ± 52	18.956 ± 5.740
1h	62 ± 14	980 ± 266	15.648 ± 4.063

3h	81 ± 1	728 ± 154	14.410 ± 2.889
7h	61 ± 24	1.306 ± 294	18.311 ± 779
24h	40 ± 36	452 ± 62	6.570 ± 2.380
48h	40 ± 7	469 ± 18	8.095 ± 4.335
96h	13 ± 9	365 ± 47	No medido
168h	No medido	No medido	7.503 ± 3.241
240h	BLQ	141 ± 12	4.047 ± 236

#### Ejemplo 24A: Estudio farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) en monos cynomolgus

Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) de una dosis única con los anticuerpos biespecíficos anti-BCMA/anti-CD3 de células T (83A10-TCBcv) en el CRO acreditado por AAALAC. Monos cynomolgus adultos biológicamente naïve de aproximadamente 2 años de edad y de aproximadamente 3 kg de peso fueron aclimatados por lo menos 40 días y seleccionados en base a su peso corporal, las observaciones clínicas y los exámenes de patología clínica. Los animales se identificaron mediante tatuajes individuales y tarjetas de las jaulas con código de colores. Todos los procedimientos con animales (incluida la vivienda, el monitoreo del estado de salud, las restricciones, dosificaciones, etc) y la revisión ética se realizó de acuerdo con la legislación actual del país impuesta por la Directiva sobre la protección de los animales utilizados para la investigación biomédica. Los animales fueron aleatoriamente asignados al grupo de tratamiento en base al peso corporal más reciente antes del ensayo. Luego de excluir a los animales con los hallazgos anteriores al ensayo inaceptables, se utilizó un programa informático incluido en el sistema Pristima<sup>®</sup> diseñado para lograr un balance con respecto al ensayo previo del peso corporal, para excluir los animales con ambos extremos de peso corporal y aleatorizar los animales remanentes al grupo de tratamiento. Los animales fueron asignados a tres grupos de tratamiento con 83A10-TCBcv (n=2 animales, es decir, 1 hembra y 1 macho por grupo) a las dosis de 0,003; 0,03; y 0,3 mg/kg. Los animales recibieron una dosis única por vía i.v. de 83A10-TCBcv y al menos se recolectaron por la vena periférica 0,8 mL de muestra de sangre por tiempo para las evaluaciones PK de acuerdo con el siguiente esquema de recolección y procedimiento: Pre-dosis, 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de la dosificación. Las muestras de sangre se dejaron coagular durante 60 min a temperatura ambiente en tubos para la separación del suero. El coágulo se sedimentó por centrifugación (al menos 10 min., 1.200g, +4 °C). El suero resultante (aproximadamente 300 µL) se guardó directamente en el -80°C hasta su posterior análisis. También se recolectaron muestras de médula ósea del fémur para la evaluación de PK bajo anestesia/ tratamiento analgésico de acuerdo con el siguiente esquema de recolección: Pre-dosis, 96 y 336 h después de la dosificación. Se dejaron coagular las muestras de médula ósea en los tubos de separación del suero durante 60 min a temperatura ambiente. El coágulo se sedimentó por centrifugación (al menos 10 min, 1.200g, +4 °C). La médula ósea resultante (aproximadamente 1 mL) se guardó directamente en el -80°C hasta su posterior análisis. Se realizó el análisis y la evaluación de los datos de PK. El análisis estándar no compartimental se llevó a cabo utilizando el paquete Watson (v 7.4, Thermo Fisher Scientific Waltman, MA, USA) o el sistema Phoenix WinNonlin (v. 6.3, Certara Company, USA). Como se observa en la Figura 26, Tabla 28, las concentraciones séricas del 83A10-TCBcv se midieron por ELISA. La Tabla 29 muestra las concentraciones del 83A10-TCBcv en médula ósea medidas por ELISA para cada grupo tratado (BLQ, significa por debajo del nivel de cuantificación).

Mucha información relevante para el potencial uso clínico del 83A10-TCBcv puede obtenerse de la Figura 26, Tabla 28 y Tabla 29:



- En los aspirados de médula ósea provenientes de los pacientes con MM, concentraciones de 1 nM o 10 nM del 83A10-TCBcv inducen una muerte significativa e incluso total de las células plasmáticas de MM; a una dosis de 0,03 mg/kg en el intervalo de tiempo que va desde su administración hasta las 168 horas (7 días), se alcanzaron concentraciones plasmáticas plasma entre aprox. 1 nM y 4 nM lo que demuestra que la terapia de una sola vez por semana a una dosis de aprox. 0,03 mg/kg bien puede ser factible (200 ng/ml corresponden aprox. 1 nM)
- La Figura 26 muestra que en el rango de dosificación investigado, la PK es en gran medida lineal con la dosis; esto significa que las concentraciones son proporcionales a la dosis, una propiedad de utilidad para la terapia clínica
- El MM es una enfermedad localizada principalmente en la médula ósea; se han detectado concentraciones de 83A10-TCBcv en médula ósea cercanas a las concentraciones séricas (Tabla 29), p.ej., a las 96 h posteriores de la administración, las concentraciones en médula ósea que se midieron fueron de aprox. 1 y 2 nM; estas son concentraciones del TCB de esta invención en las que se observa que producen la muerte de una significativa cantidad de células plasmáticas de MM en los aspirados frescos de médula ósea recolectados de los pacientes con MM; (ver Tablas 25 y 26), demostrando nuevamente la chance de que los intervalos de dosificación convenientes son de una vez por semana
- Entre las 24 y 504 horas post inyección, la eliminación es en gran parte de primer orden con una vida media de eliminación de aprox. 6-8 días, confirmando de nuevo la chance de que los intervalos de dosificación convenientes son de una vez por semana

**Tabla 28.** Concentraciones séricas del 83A10-TCBcv después del tratamiento IV en monos cynomolgus

83A10-TCBcv						
Conc. (ng/mL)	0,003 mg/kg IV		0,03 mg/kg IV		0,3 mg/kg IV	
	A	B	C	D	E	F
Pre-dosis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30 min	75,69	74,99	668,66	796,54	17.207,20	14.943,95
90 min	70,92	74,56	951,81	628,72	12.831,54	16.248,97
180 min	76,54	62,55	981,42	722,27	10.653,28	6.824,72
7 h	53,17	77,39	700,67	972,38	8.204,77	4.560,36
24 h	33,16	50,41	358,90	532,11	4.609,28	4.127,41
48 h	26,05	37,40	279,80	433,30	3.546,09	2.700,43
96 h	17,28	19,52	226,01	429,80	1.959,96	2.006,92
168 h	17,33	15,87	55,58	365,67	1.918,06	1.382,57
336 h	11,21	4,43	102,94	153,54	1.102,96	773,55

504 h	4,33	BLQ	43,99	130,14	952,03	377,04
-------	------	-----	-------	--------	--------	--------

**Tabla 29.** Concentraciones en médula ósea del 83A10-TCBcv después del tratamiento en dosis única IV en monos cynomolgus

Conc. (ng/mL)	0,003 mg/kg		0,03 mg/kg		0,3 mg/kg	
	A	B	C	D	E	F
Pre-dosis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
96 h	25,07	37,15	179,87	469,08	3.432,54	2.674,70
336 h	9,92	6,90	59,39	47,22	1.987,48	850,87

5 Mediciones farmacodinámicas (PD): Se recolectaron muestras de sangre (intervalos de tiempo: pre-dosis, 24, 48, 96, 168, 336, 504 h después de administrar la dosis) y muestras de médula ósea (intervalos de tiempo: pre-dosis, 96 y 336 h después de administrar la dosis) en tubos con 7,5% K3 EDTA para la evaluación PD mediante citometría de flujo para evaluar el efecto del 83A10-TCBcv administrado i.v. como una dosis única en células plasmáticas de sangre, células plasmáticas de médula ósea, células B, y células T. Se utilizó un método de tinción de inmunofluorescencia directa de los marcadores de superficie. Brevemente, 100 µL de sangre o de médula ósea se incubaron con dos mezclas de anticuerpos incluidos CD45/CD2/CD16/CD20/CD27/CD38 o CD45/CD2/CD16/CD4/CD25/CD8 en la oscuridad durante 30 min a +4°C. Para lisar los glóbulos rojos, se añadieron a las muestras 2 mL de una solución de buffer de lisis y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron con un buffer de tinción (PBS 2% Suero Fetal Bovino). Las muestras teñidas se mantuvieron refrigeradas, protegidas de la luz, hasta la adquisición de datos con el citómetro ese mismo día. La adquisición de datos del FACS se realizó mediante un citómetro de flujo Becton Dickinson equipado con las líneas láser de 488 y 635, BD FACS Canto II. Para la recolección y análisis de los datos se utilizó el programa BD FACSDiva software. La enumeración del número absoluto de células se realizó con una plataforma doble, basada en el recuento de WBC obtenido en el contador hematológico (ADVIATM 120, Siemens). Como se muestra en la Figura 27, se observa una redistribución periférica de células T en todos los animales que recibieron una dosis única por vía IV del tratamiento con 83A10-TCBcv como se demuestra por la disminución de los recuentos de las células T circulantes. Como se muestra en la Figura 28A, alrededor de las 24h posteriores al tratamiento con 83A10-TCBcv 0,3 mg/kg, se observó una disminución de las células plasmáticas sanguíneas (células BCMA-positivas) en los animales tratados mientras que no se evidenció una disminución de las células B totales (células BCMA-negativas). La Figura 28B muestra la cinética de disminución de las células plasmáticas sanguíneas después del tratamiento con 83A10-TCBcv 0,3 mg/kg en monos cynomolgus.

Las muestras de sangre también fueron procesadas para la recolección del plasma para el análisis de citocinas (IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ) de acuerdo con el siguiente esquema de recolección: Pre-dosis, 30, 90, 180 min, 7, 24, 48, 96, 168 h después de la administración de la dosis. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de plástico y se mantuvieron en un baño de agua helada, luego se centrifugaron (al menos 10 min, 1.200g, +4 °C). El plasma resultante se guardó directamente en el -80°C hasta su posterior análisis. El análisis de las citocinas se realizó mediante un inmunoensayo para citocinas basado en perlas Múltiplex (Tecnología Luminex). Los datos se analizaron usando el programa Bio-Plex Manager 4.1 software (Bio-Rad): se usó un modelo de regresión logística de 5 parámetros (5PL).

**Ejemplo 25: Eficacia terapéutica del anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 en modelos de ratón con xenoinjertos de mieloma humanos**

5 a) Se evaluó el efecto in vivo del anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3 en un modelo de ratón con xenoinjerto de mieloma humano. Brevemente, el día 0 (d0) del estudio, se inocularon por vía subcutánea  $5 \times 10^6$  a  $100 \times 10^6$  células  
 10 provenientes de la línea celular de mieloma humano NCI-H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) en el flanco dorsal derecho de ratones adultos inmunodeficientes NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) (The Jackson Laboratory y/o Taconic) y se dejaron injertar por 7 a 21 días o hasta que el tamaño del tumor alcance  $50 - 300 \text{ cm}^3$ , preferentemente  $100 - 200 \text{ cm}^3$ . Los ratones trasplantados fueron asignados aleatoriamente en los distintos grupos de tratamiento (n= 5 to 12). Los ratones NOG son unas de las cepas más apreciadas como modelos de ratón humanizado como se  
 15 refleja por la falta total de células inmunes, en las que se incluye la población de células NK residentes que sí pueden observarse en los ratones inmunodeficientes no irradiados SCID o RAG y que a su vez podría afectar el injerto del tumor de células xenogéneas humanas (Ito et al. Curr Top Microbiol Immunol 2008; 324: 53-76). El día 7 a día 21 (d7-d21) cuando el injerto tumoral alcanza aproximadamente un volumen de  $50 - 300 \text{ cm}^3$ , preferentemente  $100 - 200 \text{ cm}^3$ , se inocularon  $5 \times 10^6$  a  $100 \times 10^6$  de PBMC humanas aislados de las capas leucocitarias en la cavidad  
 20 peritoneal de los ratones hospederos. Los ratones de los grupos control no recibieron PBMC humanas y se usaron como controles de ratones no trasplantados para comparar con los ratones control del tratamiento con el vehículo que reciben PBMC humanas para monitorear el impacto de las células T sobre el crecimiento del tumor. El esquema de tratamiento de TCB se basa en los datos farmacocinéticos obtenidos previamente y consiste en administrar una vez por semana por vía i.v., s.c. o i.p. hasta 3-6 inyecciones del anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3. Dos días  
 25 después de la reconstitución de los receptores con los PBMC humanas (d9 to d23), se administró una primera dosis de anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3, en el rango de  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  a  $20 \text{ mg}/\text{kg}$ , preferentemente  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  a  $0,5 \text{ mg}/\text{kg}$ , vía la vena de la cola o mediante inoculación s.c. o i.p. En algunos ratones del grupo satélite, los tiempos de sangría se llevaron a cabo a los 5 min, 1 h, 8 h y 24h después de la inoculación del anticuerpo TCB anti-BCMA/anti-CD3 que con Fc 2+1 para los análisis farmacocinéticos. Tres a 7 días después del primer tratamiento con TCB, los ratones  
 30 receptores se tratados con una segunda dosis del anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3. Una hora antes de la segunda inyección con TCB, se recolectó sangre para obtener los niveles valle del anticuerpo terapéutico. Tres a 7 días después del segundo tratamiento con TCB, los ratones receptores se trataron con una tercera dosis del anticuerpo TCBCv anti-BCMA/anti-CD3, etc. El tratamiento está planificado para continuar durante 3 semanas, es decir, un esquema semanal de 6 dosis en 2 veces, respectivamente un esquema semanal de 3 dosis en una vez.  
 35 Una hora antes de la segunda (esquema semanal de dosificación en una vez), respectivamente de la cuarta inyección con TCB, la sangre se recolectó para análisis farmacocinéticos. Entre el segundo y tercer, respectivamente el cuarto y el quinto tratamiento con TCB, algunos ratones del grupo satélite se sacrificaron y utilizaron para demostrar el efecto farmacodinámico y la medición de los puntos finales, tales como la activación de células T y la función de las células T en los ratones tratados. El punto final primario se midió por el volumen del tumor. Los tumores se midieron durante el estudio con un calibrador y se evaluó el progreso mediante la  
 40 comparación intergrupar del volumen del tumor (TV). La inhibición del crecimiento del tumor T/C (%) se determinó mediante el cálculo del TC como  $T/C\% = 100 \times (\text{mediana del TV del grupo analizado}) / (\text{mediana del TV del grupo control tratado con el vehículo})$ . En algunos estudios, se utilizó como punto final primario o secundario, la supervivencia de los ratones hospederos. Alternativamente a la línea celular H929, las líneas celulares de mieloma humano RPMI-8226 (ATCC® CCL-155™), U266B1 (ATCC® TIB-196™) o L-363 (Instituto de Leibniz DSMZ – colección alemana de microorganismos y cultivos celulares; DSMZ No. ACC 49) pueden ser usadas como xenoinjertos. En algunos estudios, los ratones adultos NOD-Rag1(null)- $\gamma$  chain(null) (NRG) (The Jackson Laboratory) pueden ser usados como receptores del trasplante. En algunos estudios, los ratones receptores son tratados con  
 45 dosis comparativas de BCMAxCD3 (scFV)<sub>2</sub> (por e.j. BCMAxCD3 de células T biespecífico que se acopla a BiTE tal como se describe en WO2013/072415 y WO2013/072406) para el esquema de tratamiento de dos veces y/o una vez a la semana.

50 b) Actividad antitumoral inducida por el anticuerpo biespecífico de células T anti-BCMA/anti-CD3 en el modelo de injerto de mieloma humano H929 en ratones NOG humanizados con PBMC. Con una vida media de eliminación prolongada, los anticuerpos TCBCv anti-BCMA/anti-CD3 contenidos en el Fc pueden ser más eficaces que los anticuerpos biespecíficos basados en (scFV)<sub>2</sub>, tales como BCMA50-BiTE® al ser administrados en dosis equimolares, en un esquema semanal de una sola vez. El efecto in vivo del 83A10-TCBCv y BCMA50-BiTE® (como se describió en WO2013072415 y WO2013072406) se comparó y evaluó en el modelo de injerto de mieloma humano con H929 en los ratones NOG humanizados con PBMC. Los ratones NOG son apropiados como modelos  
 55 de ratón humanizado dado que carecen completamente de las células inmunes en las que se incluye la población de células NK residentes y son por consiguiente más permisivos para el injerto de un tumor de células xenogéneas humanas (Ito et al. Curr Top Microbiol Immunol 2008; 324: 53-76). Brevemente, el día 0 (d0) del estudio, se inocularon por vía subcutánea (SC)  $5 \times 10^6$  células provenientes de la línea celular de mieloma humano NCI-H929 (NCI-H929, ATCC® CRL-9068™) en  $100 \mu\text{L}$  de medio RPMI 1640 que contiene matrigel (BD Biosciences, Francia)

50:50 en el flanco dorsal derecho de ratones inmunodeficientes NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) hembra de 8-10 semanas de edad (Taconic, Ry, Dinamarca). Veinticuatro a 72 horas previas a la implantación SC de la célula tumoral H929, todos los ratones recibieron en todo su cuerpo una irradiación con una fuente de rayos  $\gamma$  (1,44 Gy,  $^{60}\text{Co}$ , BioMep, Bretenières, Francia). El día 15 (d15), los ratones NOG recibieron una única inyección intraperitoneal (IP) de  $2 \times 10^7$  PBMC humanas (en 500  $\mu\text{L}$  PBS 1X pH7,4). La caracterización de las PBMC humanas se realizó mediante inmunofenotipificación (citometría de flujo). Los ratones fueron cuidadosamente aleatorizados en los distintos grupos de tratamiento y control (n=9/grupo) utilizando el programa Vivo manager® software (Biosystemes, Couternon, Francia) y se llevó a cabo un análisis estadístico (análisis de la varianza) para evaluar la homogeneidad entre los grupos. El tratamiento con anticuerpos empezó el día 19 (d19), es decir, 19 días después de la inoculación SC de las células tumorales H929 cuando el volumen del tumor había alcanzado al menos 100-150  $\text{mm}^3$  en todos los ratones, con un volumen promedio del tumor de  $300 \pm 161 \text{ mm}^3$  para el grupo control del tratamiento con el vehículo,  $315 \pm 148 \text{ mm}^3$  para el grupo control del tratamiento con 2,6 nM/kg de TCB,  $293 \pm 135 \text{ mm}^3$  para el grupo del tratamiento con 2,6 nM/kg de 83A10-TCBcv y  $307 \pm 138 \text{ mm}^3$  para el grupo del tratamiento con 2,6 nM/kg de BCMA50-(scFv)<sub>2</sub> (BCMA50-BiTE®). El esquema de tratamiento con el anticuerpo TCB se basó en los resultados farmacocinéticos previamente obtenidos con el 83A10-TCBcv y consistió en la administración del anticuerpo una vez por semana por vía IV durante 3 semanas (es decir, 3 inyecciones en total del anticuerpo TCB). Cuatro días después de la reconstitución de los ratones hospederos con los PBMC humanas (d19), se administró una primera dosis de anticuerpo anti-BCMA/anti-CD3 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg respectivamente 0,5 mg/kg) vía la vena de la cola. Se recolectaron muestras de sangre mediante punción de la vena yugular/mandibular (bajo anestesia) 1h antes de cada tratamiento, 2 h antes del segundo tratamiento y al finalizar en los ratones de todos los grupos tratados con 83A10-TCBcv y control-TCBcv. Las muestras de sangre fueron inmediatamente transferidas a tubos que contenían activadores de la coagulación (tubos T MG, de tapa rojo cereza, Capiject®, Terumo®). Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min para favorecer la coagulación. Luego los tubos se centrifugaron a 1.300 g durante 5 min para separar el suero del coágulo. Se prepararon alícuotas de suero, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron en el -80°C hasta su posterior análisis. El volumen del tumor (TV) se midió con un calibrador y el progreso se evaluó mediante la comparación intergrupar del TV. El porcentaje del crecimiento del tumor definido como TG (%) se determinó mediante el cálculo  $\text{TG} (\%) = 100 \times (\text{mediana del TV del grupo analizado}) / (\text{mediana del TV del grupo control tratado con el vehículo})$ . Por razones éticas, los ratones fueron sacrificados cuando el TV alcanzó al menos 2.000  $\text{mm}^3$ . La Figura 29 muestra el TV de cada ratón individual por grupo experimental: (A) grupos control que incluyen al control del vehículo (línea completa) y al control de TCB (línea de puntos), (B) grupo 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg), y (C) BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg). En el grupo 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg), 6 de 9 ratones (67%) habían retrocedido su tumor aun por debajo del TV documentado el d19 es decir, el primer tratamiento con TCB y la regresión del tumor se mantuvieron hasta la finalización del estudio. Los 3 ratones del grupo tratado con 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg) que fracasaron en demostrar la regresión del tumor, tenían su TV igual al d19, 376, 402 y 522  $\text{mm}^3$  respectivamente. En contraste, ninguno de los 9 ratones (0%) tratados con una dosis equimolar de BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg) en un esquema semanal de una sola vez por semana durante 3 semanas tuvieron su tumor en regresión en ningún punto del tiempo. La Tabla 30 muestra la progresión del volumen del tumor a lo largo del tiempo en todos los grupos experimentales. El porcentaje del crecimiento del tumor se calculó para d19 a d43 y se comparó entre el grupo 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg) y el BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg) (Figura 30). Los resultados demuestran que el TG (%) está consistentemente y significativamente disminuido en el grupo 83A10-TCBcv (2,6 nM/kg) así como el TG (%) es siempre menor cuando se compara con BCMA50-BiTE® (2,6 nM/kg). La Tabla 31 muestra la mediana del volumen del tumor (TV) y el porcentaje de crecimiento del tumor (TG (%)) los días 19 a 43. Los resultados globales demuestran claramente que 83A10-TCBcv es superior a BCMA50-BiTE® para inducir in vivo la actividad antitumoral cuando se administra el tratamiento en dosis equimolares en un esquema de una sola dosis por semana durante 3 semanas.

**Tabla 30.** Progresión del volumen del tumor a lo largo del tiempo en ratones del grupo del control del vehículo y en ratones tratados con dosis equimolares de control-TCB, 83A10-TCBcv y BCMA50-(scFv)<sub>2</sub> (BCMA50-BiTE®)

Volumen del tumor ( $\text{mm}^3$ )	Control del vehículo Grupo A										
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	Promedio	SD
Día 5	95	58	63	71	63	68	67	65	36	65	15

ES 2 602 051 T3

Día 8	70	61	71	70	56	68	74	70	49	66	8
Día 12	66	65	53	50	57	58	60	59	56	58	5
Día 15	101	95	131	80	61	65	89	37	161	91	37
Día 19	333	327	566	123	197	191	444	92	427	300	161
Día 23	565	481	1.105	470	310	309	517	281	581	513	249
Día 27	1.071	877	1.989	823	560	675	1.089	530	870	943	440
Día 30	1.870	1.129	x	419,2	867	1.060	1.368	673	1.331	1.090	450
Día 34	X	1.653		507	1.056	1.521	1.805	1.008	2.042	1.370	535
Día 37		2.140		2.043	1.309	2.017	2.394	1.267	X	1.862	464
Día 40		x		x	1.592	x	x	1.346		1.469	174
Día 43					1.548			1.994		1.771	314
Día 47					x			x			
Día 51											

Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> )	2,6 nM/kg Control TCB Grupo B										
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	Promedio	SD
Día 5	68	65	84	83	46	63	73	74	67	69	11
Día 8	55	64	54	73	60	103	56	55	76	66	16
Día 12	45	92	73	76	83	78	103	69	76	77	16

ES 2 602 051 T3

Día 15	72	169	64	99	69	150	223	115	88	117	54
Día 19	257	334	71	318	268	460	602	236	285	315	148
Día 23	430	773	95	444	553	738	808	381	461	520	227
Día 27	924	1252	232	780	768	1.009	915	606	630	791	289
Día 30	1.191	1.714	326	867	1.230	1.349	1.118	817	783	1.044	398
Día 34	1.684	x	592	1.466	1.660	1.954	1.765	1.180	576	1.359	529
Día 37	2.522		597	1.735	1.105	x	x	1.402	861	1.370	691
Día 40	X		978	2.388	1.952			2.277	1.365	1.792	604
Día 43			1.302	x	x			x	1.895	1.599	419
Día 47			2.346						2.373	2.359	19
Día 51			x						X		

Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> )	2,6 nM/kg 83A10-TCBcv Grupo C										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	Promedio	SD
Día 5	78	79	55	77	53	47	39	53	60	60	15
Día 8	69	37	67	75	62	59	59	77	75	64	12
Día 12	58	61	60	69	48	59	46	63	87	61	12
Día 15	136	41	61	138	48	57	76	71	217	94	58
Día 19	376	151	238	522	154	133	377	287	402	293	135
Día 23	656	322	375	847	311	249	642	395	681	498	210

ES 2 602 051 T3

Día 27	1.119	376	443	1.400	253	253	678	371	1.166	673	441
Día 30	1.607	187	260	1.975	88	113	219	191	1.590	692	783
Día 34	2.143	68	100	x	34	54	63	53	2.429	618	103 3
Día 37	X	41	44		43	34	34	35	x	38	5
Día 40		64	40		43	38	32	39		43	11
Día 43		40	43		33	24	32	25		33	8
Día 47		14	21		16	12	19	14		16	3
Día 51		15	30		20	20	15	18		20	6

Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> )	2,6 nM/kg BCMA50-(scFv) <sub>2</sub> (BCMA50-BiTE®) Grupo D										
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	Promedio	SD
Día 5	75	92	78	86	57	91	74	58	62	75	13
Día 8	51	87	61	99	70	88	90	73	71	77	15
Día 12	70	73	63	76	84	76	85	58	113	78	16
Día 15	142	72	61	128	87	77	121	60	188	104	44
Día 19	232	212	81	474	303	260	360	304	539	307	138
Día 23	560	483	121	811	665	408	654	457	1.115	586	278
Día 27	827	879	216	1.224	1.092	732	886	908	1.526	921	359
Día 30	1026	1414	227	1.476	1.373	1.256	1.210	1.228	2.433	1.294	567
Día 34	1368	1855	418	2.185	1.734	1.936	1.465	1.645	X	1.576	535

ES 2 602 051 T3

Día 37	1.691	2.754	599		2.542		2.102	2.062		1.958	765
Día 40	2.764	x	706		x		x	x		1.735	1.455
Día 43	X		807							807	n/a
Día 47			x								
Día 51											

**Tabla 31.** Mediana del volumen tumoral (TV) y porcentaje de crecimiento del tumor (TG (%)) los días 19 a 43: 83A10-TCBcv en comparación con BCMA50-BiTE®.

Inhibición del crecimiento del tumor TG <sub>inh</sub> (%)	Control del tratamiento con el vehículo		83A10-TCBcv 2,6 nM/kg		BCMA50-BiTE® 2,6 nM/kg		Control-TCB 2,6 nM/kg	
	Mediana del TV	TG (%)	Mediana del TV	TG (%)	Mediana del TV	TG (%)	Mediana del TV	TG (%)
Día 19	327	100	287	87,8	303	92,7	285	87,2
Día 23	481	100	395	82,1	560	116,4	461	95,8
Día 27	870	100	443	50,9	886	101,8	780	89,7
Día 30	1.094,5	100	219	20,0	1.256	114,8	1.118	102,1
Día 34	1.521	100	65,5	4,3	1.689,5	111,1	1.563	102,8
Día 37	2.030	100	38	1,9	2.082	102,6	1.253,5	61,7
Día 40	1.469	100	39,5	2,7	1.735	118,1	1.952	132,9
Día 43	1.771	100	32,5	1,8	807	45,6	1.598,5	90,3
Día 47	/	/	15	/	/	/	2.359,5	/



ES 2 602 051 T3

Día 51	/	/	19	/	/	/	/	/
--------	---	---	----	---	---	---	---	---

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> ENGMAB AG
- <120> ANTICUERPO BIESPECIFICO CONTRA CD3EPSILON Y BCMA
- <130> TCBCV-EP1
- 10 <150> EP14179705.0  
<151> 2014-08-04
- <160> 130
- 15 <170> BiSSAP 1.3
- <210> 1  
<211> 14  
<212> PRT
- 20 <213> Mus musculus
- <400> 1  
Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Tyr Tyr Pro Asn  
1 5 10
- 25 <210> 2  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus
- 30 <400> 2  
Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro  
1 5
- 35 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus
- 40 <400> 3  
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val  
1 5
- 45 <210> 4  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

ES 2 602 051 T3

<400> 4  
 Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn  
 1 5 10  
 5  
 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 10  
 <400> 5  
 Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Val Lys Asp  
 15  
 <210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 20 <213> Mus musculus  
 <400> 6  
 His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr  
 1 5 10  
 25  
 <210> 7  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 30  
 <400> 7  
 Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly  
 35 20 25 30  
 Tyr Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 40 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 45 100 105  
 <210> 8  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 50 <213> Mus musculus

ES 2 602 051 T3

<400> 8  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr  
 5 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 10 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp  
 15 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 9  
 20 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Sequencia artificial

<220>  
 25 <223> Primer

<400> 9  
 aagcttggat ccatggtgca gatggctggg cagtgctcc 39

30 <210> 10  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Sequencia artificial

35 <220>  
 <223> Primer

<400> 10  
 40 gaattcgcgg ccgctcatcc tttcactgaa ttggtcacac ttgcattac 49

<210> 11  
 <211> 42  
 45 <212> ADN  
 <213> Sequencia artificial

<220>  
 <223> Primer

50 <400> 11

ES 2 602 051 T3

acgtagatc tccactcagt cctgcatctt gttccagtta ac 42

5 <210> 12  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Sequencia artificial

10 <220>  
 <223> Primer

<400> 12  
 aacggtgcgg ccgctagttt cacaaacccc agg 33

15 <210> 13  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Sequencia artificial

20 <220>  
 <223> Primer

25 <400> 13  
 gaattcaagc ttgccacat gttgcagatg gctgggcagt gctcc 45

30 <210> 14  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Sequencia artificial

35 <220>  
 <223> Primer

<400> 14  
 gaattctcta gattacctag cagaaattga tttctctatc tccgtagc 48

40 <210> 15  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <223> BCMA VH

<400> 15  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 50 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 602 051 T3

20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 5 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 10 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 15 <210> 16  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <220>  
 <223> BCMA VH  
  
 <400> 16  
 25 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 30 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 35 Ala Lys Val Ala Pro Tyr Phe Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 40 <210> 17  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 45 <220>  
 <223> BCMA VH  
  
 <400> 17  
 50 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

ES 2 602 051 T3

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
                   20                  25                  30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                  40                  45  
 5 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
           50                  55                  60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
   65                  70                  75                  80  
 10 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                   100                  105                  110  
 Thr Val Ser Ser  
           115  
 15 <210> 18  
       <211> 109  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
 20 <220>  
       <223> BCMA VL  
       <400> 18  
 25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
   1                  5                  10                  15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                   20                  25                  30  
 30 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
           35                  40                  45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
   50                  55                  60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
   65                  70                  75                  80  
 35 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro  
                   85                  90                  95  
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                  105  
 40 <210> 19  
       <211> 109  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens  
 45 <220>  
       <223> BCMA VL  
       <400> 19  
 50 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
   1                  5                  10                  15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

ES 2 602 051 T3

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

<210> 20  
 <211> 111  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> BCMA VL

20 <400> 20  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 25 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 30 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 35 Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 21  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> CDR1H

45 <400> 21  
 Ser Tyr Ala Met Ser  
 1 5

50 <210> 22  
 <211> 5  
 <212> PRT

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> CDR1H  
 5 <400> 22  
 Ser Tyr Ala Met Ser  
 1 5  
 10 <210> 23  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <220>  
 <223> CDR1H  
 <400> 23  
 Ser Tyr Trp Ile Gly  
 20 1 5  
 <210> 24  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> CDR2H  
 30 <400> 24  
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 35 <210> 25  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40 <220>  
 <223> CDR2H  
 <400> 25  
 45 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 50 <210> 26  
 <211> 17



ES 2 602 051 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 5 <223> CDR2H  
  
 <400> 26  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15  
 10 Gly  
  
 <210> 27  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> CDR3H  
 20  
 <400> 27  
 Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr  
 1 5  
 25 <210> 28  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 30 <220>  
 <223> CDR3H  
  
 <400> 28  
 Val Ala Pro Tyr Phe Ala Pro Phe Asp Tyr  
 35 1 5 10  
  
 <210> 29  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> CDR3H  
  
 45 <400> 29  
 Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr  
 1 5  
  
 <210> 30  
 50 <211> 12  
 <212> PRT

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens  
<220>  
<223> CDR1L  
5  
<400> 30  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10  
10 <210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15 <220>  
<223> CDR1L  
<400> 31  
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
20 1 5 10  
<210> 32  
<211> 16  
<212> PRT  
25 <213> Homo sapiens  
<220>  
<223> CDR1L  
30 <400> 32  
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
1 5 10 15  
35 <210> 33  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
40 <220>  
<223> CDR2L  
<400> 33  
45 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5  
<210> 34  
<211> 7  
50 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 602 051 T3

<220>  
 <223> CDR2L  
  
 5 <400> 34  
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5  
  
 10 <210> 35  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 15 <220>  
 <223> CDR2L  
  
 <400> 35  
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser  
 1 5  
 20 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <220>  
 <223> CDR3L  
  
 <400> 36  
 30 Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr  
 1 5 10  
  
 <210> 37  
 <211> 10  
 35 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> CDR3L  
 40 <400> 37  
 Gln Gln Tyr Gly Asn Pro Pro Leu Tyr Thr  
 1 5 10  
  
 45 <210> 38  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 50 <220>  
 <223> CDR3L

ES 2 602 051 T3

<400> 38  
 Met Gln Ala Met Gln Ile Pro Thr  
 1 5

5

<210> 39  
 <211> 689  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<220>  
 <223> knob HC

<400> 39

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

25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125

30 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140  
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160

35 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175  
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

40 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205  
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly  
 225 230 235 240

45 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 245 250 255  
 Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 260 265 270  
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr  
 275 280 285

50 Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg

ES 2 602 051 T3

	290					295						300					
	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
	305					310					315					320	
5	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	
					325					330					335		
	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				340					345					350			
	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	
			355					360					365				
10	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	
		370					375						380				
	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	
	385					390					395				400		
15	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	
				405					410						415		
	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	
				420					425					430			
	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	
		435						440					445				
20	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	
		450					455					460					
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	
	465					470					475				480		
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
25				485						490					495		
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				500					505					510			
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		515						520					525				
30	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
		530					535					540					
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
		545				550					555				560		
35	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
				565						570					575		
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				580					585					590			
	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	
			595				600						605				
40	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
		610					615					620					
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
		625				630					635				640		
45	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				645						650					655		
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
				660					665					670			
	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
			675				680						685				
50	Lys																

ES 2 602 051 T3

<210> 40  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <223> HC entera  
  
 10 <400> 40  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 15 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 25 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125  
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140  
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160  
 30 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175  
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190  
 35 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205  
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 40 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 45 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 50 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

ES 2 602 051 T3

				325					330					335		
	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro
				340					345					350		
5	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val
			355					360					365			
	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
		370					375					380				
	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	385					390					395					400
10	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				405						410						415
	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				420					425					430		
15	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			435					440					445			
	<210> 41															
	<211> 214															
	<212> PRT															
20	<213> Homo sapiens															
	<220>															
	<223> CD3 LC															
25	<400> 41															
	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
				20				25						30		
30	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly
			35					40					45			
	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
	50					55						60				
35	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala
	65					70					75				80	
	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
				85						90					95	
	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala
				100				105						110		
40	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
			115					120						125		
	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
	130					135						140				
45	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
	145					150					155					160
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
				165						170					175	
	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
				180				185						190		
50	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
			195					200					205			

ES 2 602 051 T3

Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210

<210> 42  
 5 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 10 <223> BCMA LC

<400> 42  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 15 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 20 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro  
 85 90 95  
 25 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
 100 105 110  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 115 120 125  
 30 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 130 135 140  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 165 170 175  
 35 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 180 185 190  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 195 200 205  
 40 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 43  
 <211> 671  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> knob HC

50 <400> 43  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly



ES 2 602 051 T3

	1			5					10				15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25				30			
5	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75				80	
10	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110		
15	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115					120					125			
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
		130					135					140				
	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145					150					155				160	
20	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165						170					175	
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180						185				190			
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
25			195					200					205			
	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly
		210					215					220				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu
	225					230					235				240	
30	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr
				245						250					255	
	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro
			260						265					270		
	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
35			275					280					285			
	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala
		290					295					300				
	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
	305				310						315				320	
40	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
				325						330					335	
	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
			340						345					350		
45	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
			355					360					365			
	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
		370					375					380				
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
	385					390					395				400	
50	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				405						410					415	

ES 2 602 051 T3

```

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
      420      425      430
5 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
      435      440      445
5 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
      450      455      460
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
465      470      475      480
10 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
      485      490      495
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
      500      505      510
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
      515      520      525
15 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
      530      535      540
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
545      550      555      560
20 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      565      570      575
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
      580      585      590
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
      595      600      605
25 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
      610      615      620
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
625      630      635      640
30 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
      645      650      655
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      660      665      670

<210> 44
35 <211> 446
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

<220>
40 <223> HC completa

<400> 44
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10
45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

```

ES 2 602 051 T3

	65				70				75				80			
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
5	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110		
	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115					120					125			
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
		130				135						140				
10	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145					150						155				160
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165						170					175	
15	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180						185					190		
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195					200					205			
	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
		210					215					220				
20	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	225					230					235					240
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245						250					255	
25	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265						270		
	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
			275					280					285			
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
		290					295					300				
30	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
	305					310					315					320
	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325						330					335	
35	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro
			340						345					350		
	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val
			355					360						365		
	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
		370					375					380				
40	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	385					390						395				400
	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				405						410					415	
45	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420						425					430		
	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			435					440					445			
50	<210>	45														
	<211>	232														
	<212>	PRT														

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 VH\_CL

5

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 10 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 15 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 20 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val  
 115 120 125  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 130 135 140  
 25 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 145 150 155 160  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 165 170 175  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 180 185 190  
 30 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 195 200 205  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 210 215 220  
 35 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 46

<211> 216

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> BCMA cv LC

45

<400> 46

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

ES 2 602 051 T3

			35				40				45					
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
		50					55					60				
5	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
	65					70					75				80	
	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro
				85						90					95	
	Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
				100					105						110	
10	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys
			115					120						125		
	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
		130					135					140				
15	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
	145					150					155				160	
	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
					165					170					175	
	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
				180					185						190	
20	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
			195					200						205		
	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
		210					215									
25	<210>	47														
	<211>	674														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
30	<220>															
	<223>	BCMA cv HC knob														
	<400>	47														
35	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
40	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55						60			
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70						75			80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
45				85						90					95	
	Ala	Lys	Val	Ala	Pro	Tyr	Phe	Ala	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115					120					125			
50	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
		130					135						140			

ES 2 602 051 T3

	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165					170					175	
5	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190		
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly
10		210					215					220				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly
					245						250				255	
15	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln
				260						265					270	
	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys
			275					280					285			
	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly
20		290					295					300				
	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu
	305					310					315					320
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly
					325					330					335	
25	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				340					345					350		
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
			355					360					365			
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
30		370					375					380				
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
	385					390					395					400
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
					405					410					415	
35	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
				420					425					430		
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
			435					440					445			
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
40		450					455					460				
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
	465					470						475				480
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
					485					490					495	
45	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				500					505					510		
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
			515					520					525			
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
50		530					535					540				
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu

ES 2 602 051 T3

```

545              550              555              560
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
              565              570              575
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
5
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
              580              585              590
              595              600              605
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
              610              615              620
10 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
625              630              635              640
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
              645              650              655
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
15
Gly Lys              660              665              670

<210> 48
20 <211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
25 <223> BCMA cv HC completa

<400> 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
40 Ala Lys Val Ala Pro Tyr Phe Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115          120          125
45 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130          135          140
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145          150          155          160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165          170          175
50 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180          185          190

```

## ES 2 602 051 T3

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220  
 5 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255  
 10 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300  
 15 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 20 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
 355 360 365  
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 25 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 30 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445  
 Lys  
 35  
 <210> 49  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <220>  
 <223> BCMA cv LC  
 <400> 49  
 45 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 50 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser



ES 2 602 051 T3

	50					55						60					
	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	
	65					70					75					80	
5	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Asn	Pro	Pro	
					85					90					95		
	Leu	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	
				100					105					110			
	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys	
			115					120					125				
10	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	
		130					135					140					
	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	
	145					150					155					160	
15	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	
					165					170					175		
	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	
				180					185					190			
	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	
			195					200					205				
20	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
		210					215										
	<210> 50																
	<211> 671																
25	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
	<220>																
	<223> BCMA cv HC knob																
30	<400> 50																
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
35	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
40	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70						75				80	
	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
45	Ala	Arg	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
				100					105					110			
	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
				115				120					125				
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
		130					135					140					
50	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
	145					150					155					160	

ES 2 602 051 T3

	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
					165					170					175	
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				180					185					190		
5	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195					200					205			
	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly
		210					215					220				
10	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu
	225					230					235					240
	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr
					245					250						255
	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro
				260					265					270		
15	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
			275					280					285			
	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala
		290					295					300				
20	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
	305					310					315					320
	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
					325					330						335
	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
				340					345					350		
25	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
			355					360					365			
	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
		370					375					380				
30	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
	385					390					395					400
	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
					405					410						415
	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				420					425					430		
35	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
			435					440					445			
	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
		450					455					460				
40	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
	465					470					475					480
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
					485					490						495
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
				500					505					510		
45	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
			515					520					525			
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
		530					535					540				
50	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
	545					550					555					560
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro

ES 2 602 051 T3

				565					570					575		
	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu
				580					585					590		
5	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			595					600					605			
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
		610					615					620				
	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
	625					630					635					640
10	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
					645					650					655	
	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
				660					665					670		
15	<210> 51															
	<211> 446															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
20	<220>															
	<223> BCMA cv HC completa															
	<400> 51															
25	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
30	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50						55					60				
	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
35				85						90					95	
	Ala	Arg	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110		
	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
				115				120						125		
40	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130						135						140			
	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145					150						155				160
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
45				165						170						175
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				180					185					190		
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195					200					205			
50	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
	210						215						220			

ES 2 602 051 T3

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 5 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 10 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 15 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val  
 355 360 365  
 20 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
 25 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 30 <210> 52  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35 <220>  
 <223> BCMA cv LC  
 <400> 52  
 40 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 45 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 50 Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

ES 2 602 051 T3

100 105 110  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys  
 115 120 125  
 5 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 130 135 140  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 165 170 175  
 10 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 180 185 190  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 195 200 205  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 15 210 215  
  
 <210> 53  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 53  
 Ser Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr  
 1 5  
 25  
 <210> 54  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 30  
 <400> 54  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 35 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 40 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg Ser Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 <210> 55  
 50 <211> 7  
 <212> PRT

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens

<400> 55  
 Thr Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr  
 5 1 5

<210> 56  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens

<400> 56  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 15 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 20 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 25 Ala Arg Thr Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

30 <210> 57  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 57  
 Glu Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr  
 1 5

40 <210> 58  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 58  
 45 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 50 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

ES 2 602 051 T3

```

          50                      55                      60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
5                      85                      90                      95
Ala Arg Glu Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100                      105                      110
Thr Val Ser Ser
          115
10
<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15
<400> 59
Gln Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr
1                      5
20
<210> 60
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1                      5                      10                      15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
          20                      25                      30
30 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
          35                      40                      45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
          50                      55                      60
35 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85                      90                      95
Ala Arg Gln Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100                      105                      110
40 Thr Val Ser Ser
          115

<210> 61
<211> 7
45 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Ala Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr
50 1                      5

```

ES 2 602 051 T3

<210> 62  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 62  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 10 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 15 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 20 Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

25 <210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 63  
 Gly Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr  
 1 5

35 <210> 64  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 64  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 40 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 45 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 50 Ala Arg Gly Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val



ES 2 602 051 T3

			100					105							110	
	Thr	Val	Ser	Ser												
			115													
5	<210>	65														
	<211>	7														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
10	<400>	65														
	Asn	Ala	Tyr	Leu	Gly	Asp	Tyr									
	1				5											
	<210>	66														
15	<211>	116														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	66														
20	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30			
	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
25			35					40					45			
	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50					55					60				
	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
						70					75					80
30	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	Asn	Ala	Tyr	Leu	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110		
	Thr	Val	Ser	Ser												
35			115													
	<210>	67														
	<211>	7														
	<212>	PRT														
40	<213>	Homo sapiens														
	<400>	67														
	Asn	Glu	Tyr	Leu	Gly	Asp	Tyr									
	1				5											
45	<210>	68														
	<211>	116														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
50	<400>	68														

ES 2 602 051 T3

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

<210> 69  
 <211> 7  
 20 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 69  
 25 Asn Gln Tyr Leu Gly Asp Tyr  
 1 5

<210> 70  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens

<400> 70  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 35 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 40 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg Asn Gln Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

50 <210> 71  
 <211> 16

ES 2 602 051 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 71

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

10 <210> 72  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 72

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

30 <210> 73  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 73

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

40 <210> 74  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

ES 2 602 051 T3

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

<210> 75  
 <211> 16  
 <212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 75

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Glu Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 1 5 10 15  
 20

<210> 76  
 <211> 111  
 <212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 76

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

<210> 77  
 <211> 16  
 <212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 77

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gln Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 1 5 10 15  
 50

ES 2 602 051 T3

5 <210> 78  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 78  
 10 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 15 Gln Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 20 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110  
  
 25 <210> 79  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 30 <400> 79  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Ala Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 1 5 10 15  
  
 35 <210> 80  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 40 <400> 80  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 45 20 25 30  
 Ala Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 50 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

ES 2 602 051 T3

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95  
Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

5  
<210> 81  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10  
<400> 81  
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Gly Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
1 5 10 15

15  
<210> 82  
<211> 111  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens

<400> 82  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
25 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30  
Gly Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
30 50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95  
35 Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 83  
<211> 16  
40 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 83  
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Ala Tyr Asn Tyr Leu Asp  
45 1 5 10 15

<210> 84  
50 <211> 111  
<212> PRT

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

<210> 85

20 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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

30 <210> 86

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 86

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

50 <210> 87

ES 2 602 051 T3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 87  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gln Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 1 5 10 15

10 <210> 88  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 88  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 20 25 30  
 Asn Gln Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 25 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95  
 Met Gln Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 30 100 105 110

<210> 89  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 35 <213> Homo sapiens

<400> 89  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15  
 40 Gly

<210> 90  
 <211> 116  
 45 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 90  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 50 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr



ES 2 602 051 T3

20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 5 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 10 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 15 <210> 91  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <400> 91  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 25  
 <210> 92  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 30  
 <400> 92  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 35 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 40 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 <210> 93  
 50 <211> 17  
 <212> PRT

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

<210> 94

10 <211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 95

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

<210> 96

<211> 116

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

50 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

ES 2 602 051 T3

20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 5 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Gln Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 10 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 15 <210> 97  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <400> 97  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 25  
 <210> 98  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 30  
 <400> 98  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 35 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 40 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 <210> 99  
 50 <211> 17  
 <212> PRT

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens

<400> 99

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

<210> 100

10 <211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

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

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 101

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

<210> 102

<211> 116

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

50 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

ES 2 602 051 T3

20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 5 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ala Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 10 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 15 <210> 103  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <400> 103  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 25  
 <210> 104  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 30  
 <400> 104  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 35 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 40 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 45 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
  
 <210> 105  
 50 <211> 17  
 <212> PRT

ES 2 602 051 T3

<213> Homo sapiens

<400> 105  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Gln Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 5 1 5 10 15  
 Gly

<210> 106  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 106  
 15 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 20 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Gln Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 25 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 30 115

<210> 107  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 35 <213> Homo sapiens

<400> 107  
 Ser Tyr Phe Ile Gly  
 1 5

40 <210> 108  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 108  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 50 20 25 30  
 Phe Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 602 051 T3

```

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

    <210> 109
    <211> 5
15  <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 109
    Ser Tyr Tyr Ile Gly
20  1              5

    <210> 110
    <211> 116
    <212> PRT
25  <213> Homo sapiens

    <400> 110
    Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
    1              5              10              15
30  Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
          20              25              30
    Tyr Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
          35              40              45
35  Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
          50              55              60
    Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
    65              70              75              80
    Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85              90              95
40  Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100              105              110
    Thr Val Ser Ser
          115

45  <210> 111
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

50  <400> 111
    Ser Tyr Val Ile Gly

```

## ES 2 602 051 T3

1 5

<210> 112  
<211> 116  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 112  
10 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Val Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
15 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60  
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
20 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser  
115

25

<210> 113  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30

<400> 113  
Ser Tyr Ile Ile Gly  
1 5

35

<210> 114  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40

<400> 114  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
45 Ile Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60  
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
50 65 70 75 80  
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys



ES 2 602 051 T3

Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 5 115  
 <210> 115  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 115  
 Ser Tyr Leu Ile Gly  
 1 5  
 15 <210> 116  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 116  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 30 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 35 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
 40 <210> 117  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 117  
 45 Ser Tyr Ala Ile Gly  
 1 5  
 <210> 118  
 <211> 116  
 50 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 602 051 T3

<400> 118  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 5 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 10 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 15 Ala Arg Asn Gly Tyr Leu Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

20 <210> 119  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 119  
 Val Leu Gly Phe Phe Asp Tyr  
 1 5

30 <210> 120  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 120  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 40 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Leu Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 50 115

ES 2 602 051 T3

<210> 121  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 121  
 Val Leu Gly Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

10 <210> 122  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 122  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 25 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Leu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

30 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 123  
 <211> 7  
 35 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 123  
 Val Leu Gly Val Phe Asp Tyr  
 40 1 5

<210> 124  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens

<400> 124  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

ES 2 602 051 T3

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

<210> 125  
15 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 125  
20 Val Leu Gly Ile Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 126  
25 <211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 126  
30 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 35 40 45  
35 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
40 85 90 95  
Ala Lys Val Leu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser  
115

45 <210> 127  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50 <400> 127

ES 2 602 051 T3

Val Leu Gly Leu Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 128  
 5 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 128  
 10 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 15 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Leu Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 25 115

<210> 129  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens

<400> 129  
 Val Leu Gly Ala Phe Asp Tyr  
 1 5

35 <210> 130  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 130  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 45 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

ES 2 602 051 T3

	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110		
5	Thr	Val	Ser	Ser												
			115													

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos blancos que son el dominio extracelular del antígeno de maduración de células B humano (también llamado "BCMA") y el CD3 $\epsilon$  (también llamado "CD3"), que se caracteriza por comprender a
- 5 a) la primera cadena liviana y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA;
- b) la segunda cadena liviana y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente al CD3, y en donde los dominios variables VL y VH en la segunda cadena liviana y en la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo son sustituidos uno por otro; y en donde
- 10 c) en el dominio constante CL de la primera cadena liviana en a) el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).
- 15 2. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a los dos blancos que son el dominio extracelular del BCMA humano y el CD3 humano, que se caracteriza por comprender a
- a) la primera cadena liviana y la primera cadena pesada de un primer anticuerpo que se une específicamente al BCMA; y
- 20 b) la segunda cadena liviana y la segunda cadena pesada de un segundo anticuerpo que se une específicamente al CD3, y en donde los dominios variables VL y VH en la segunda cadena liviana y en la segunda cadena pesada del segundo anticuerpo son sustituidos uno por otro; y en donde
- 25 c) en el dominio constante CL de la segunda cadena liviana en b) el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).
- 30 3. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo biespecífico comprende además un fragmento Fab de dicho primer anticuerpo (también llamado "BCMA-Fab") y en el dominio constante CL de dicho BCMA-Fab el aminoácido en la posición 124 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat), y en donde en el dominio constante CH1 de dicho BCMA-Fab el aminoácido en la posición 147 y el aminoácido en la posición 213 son sustituidos independientemente por el ácido glutámico (E), o el ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con Kabat).
4. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque dicho anticuerpo biespecífico comprende además un segundo fragmento Fab de dicho primer anticuerpo ("BCMA-Fab").
- 35 5. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque además de la sustitución aminoacídica en la posición 124 en el dominio constante (CL), el aminoácido en la posición 123 es sustituido independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

6. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el aminoácido 124 es K, el aminoácido 147 es E, el aminoácido 213 es E, y el aminoácido 123 es R.
7. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al dominio extracelular del BCMA humano y al CD3 humano, caracterizado porque comprende un set de cadenas pesadas y livianas seleccionado entre el grupo constituido por los polipéptidos
- 5
- i) SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, y SEQ ID NO:46 (set 1),
  - ii) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, y SEQ ID NO:49 (set 2), y
  - iii) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, y SEQ ID NO:52 (set 3).
8. Un anticuerpo, de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque en la porción del anticuerpo que se une específicamente al CD3, el dominio variable VH es sustituido por el dominio variable VH que comprende a las CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 1, 2 y 3 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, y el dominio variable VL es sustituido por un dominio variable VL que comprende a las CDR de cadena liviana de SEQ ID NO: 4, 5 y 6 como las respectivas CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana, del anticuerpo anti CD3ε.
- 10
9. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se juntan en una interfase que comprende una interfase original entre los dominios CH3 del anticuerpo; en donde dicha interfase está alterada para promover la formación del anticuerpo biespecífico, en donde la alteración está caracterizada porque:
- 15
- a) el dominio CH3 de una cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original el dominio CH3 de una cadena pesada que se junta con la interfase original del dominio CH3 de la otra cadena pesada dentro del anticuerpo biespecífico, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral de volumen más grande, generando de este modo una protuberancia dentro de la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada que se posiciona en una cavidad dentro de la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada y
  - 20
  - b) el dominio CH3 de la otra cadena pesada está alterado, para que dentro de la interfase original del segundo dominio CH3 que se junta con la interfase original del primer dominio CH3 dentro del anticuerpo biespecífico, un residuo aminoacídico es sustituido por un residuo aminoacídico con una cadena lateral de volumen más pequeño, generando una cavidad dentro de la interfase del segundo dominio CH3 dentro de la cual se posiciona una protuberancia dentro de la interfase del primer dominio CH3.
  - 25
10. Un método para la preparación de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende a las etapas de
- 30
- a) transformar una célula hospedera con vectores que comprenden a moléculas de ácido nucleico que codifican para una cadena liviana y una cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
  - 35
  - b) cultivar la célula hospedera bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo; y
  - c) recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.
11. Una célula hospedera que comprende a los vectores que comprenden a las moléculas de ácido nucleico que codifican para la cadena liviana y la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40
12. Una composición farmacéutica que comprende a un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y a un excipiente farmacéuticamente aceptable.



13. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso como un medicamento.

14. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso como un medicamento para el tratamiento de desórdenes de las células plasmáticas como el Mieloma Múltiple.

5

Fig. 1

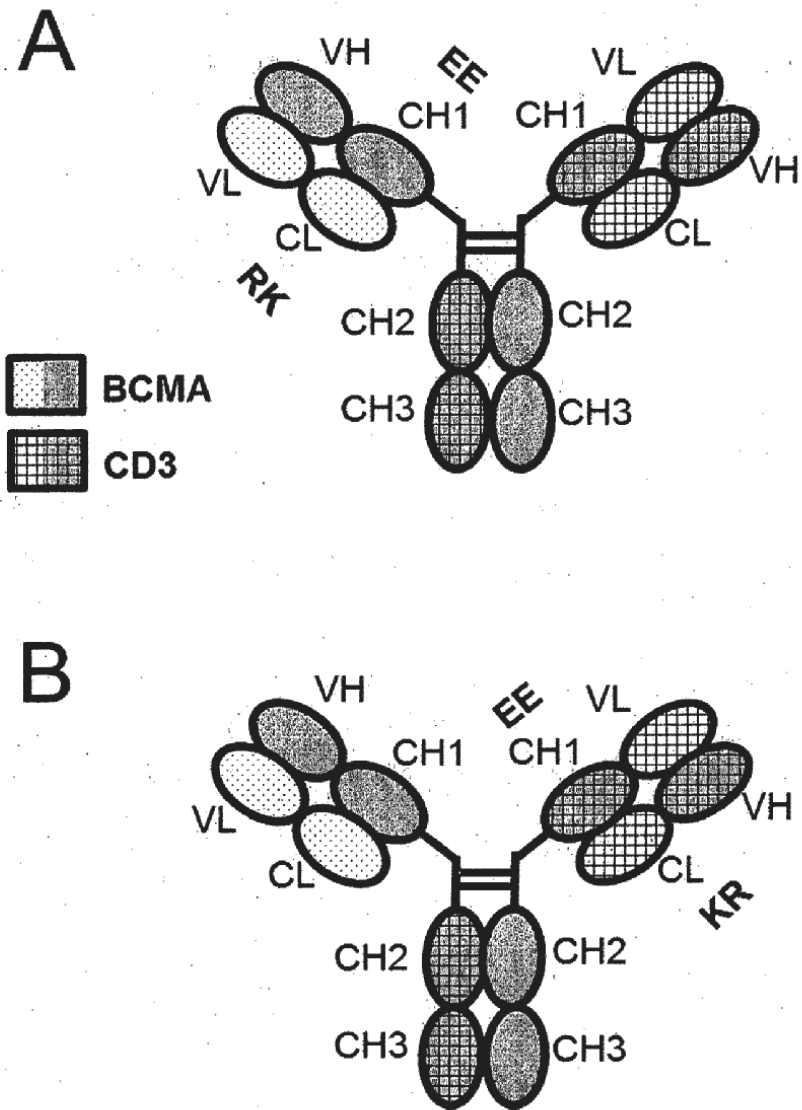


Fig. 2

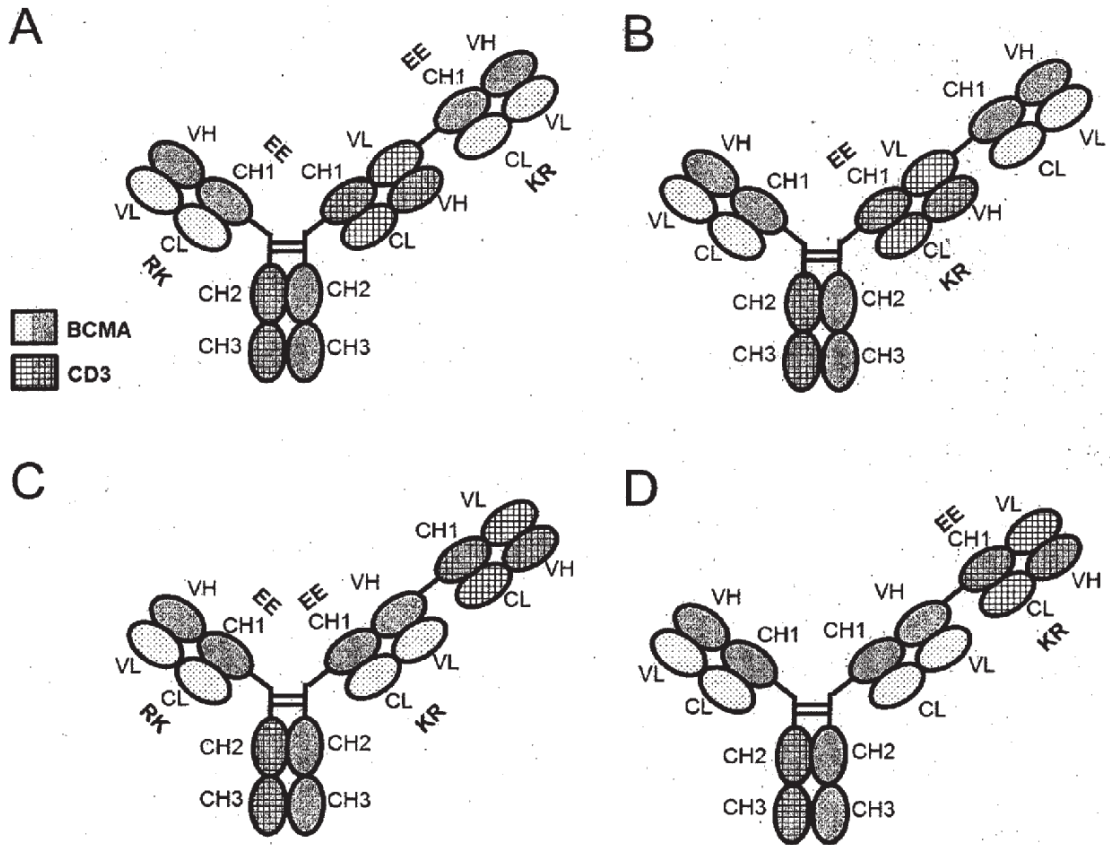


Fig. 3

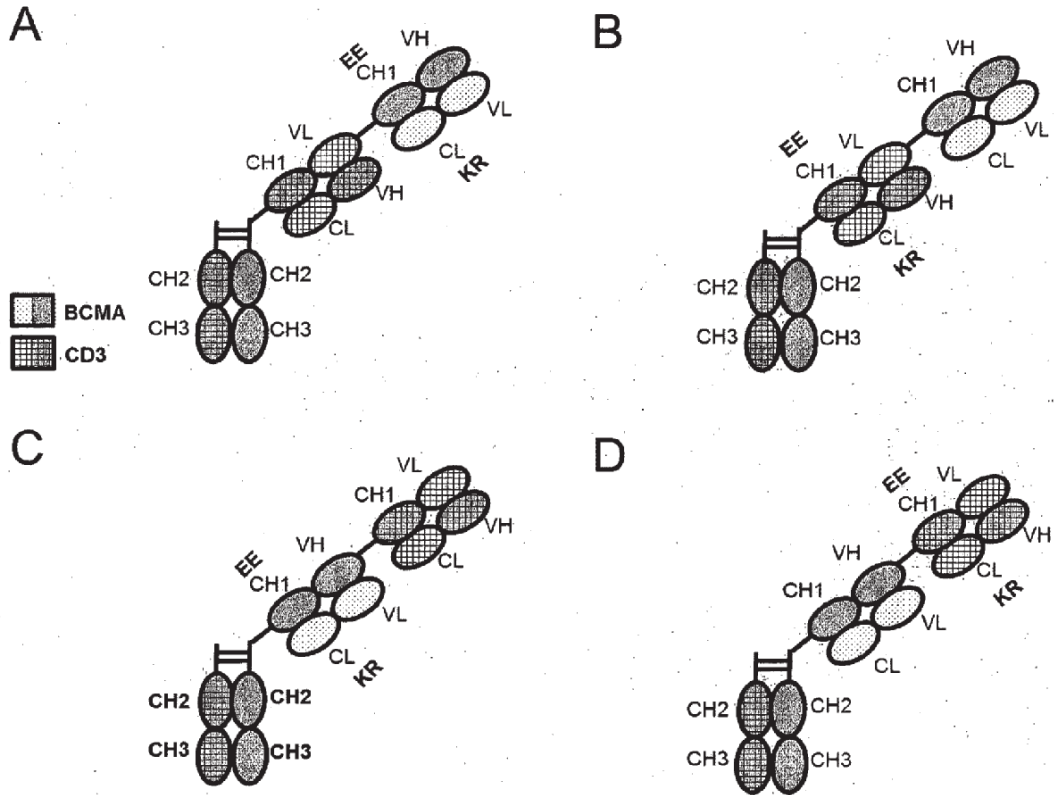


Fig. 4

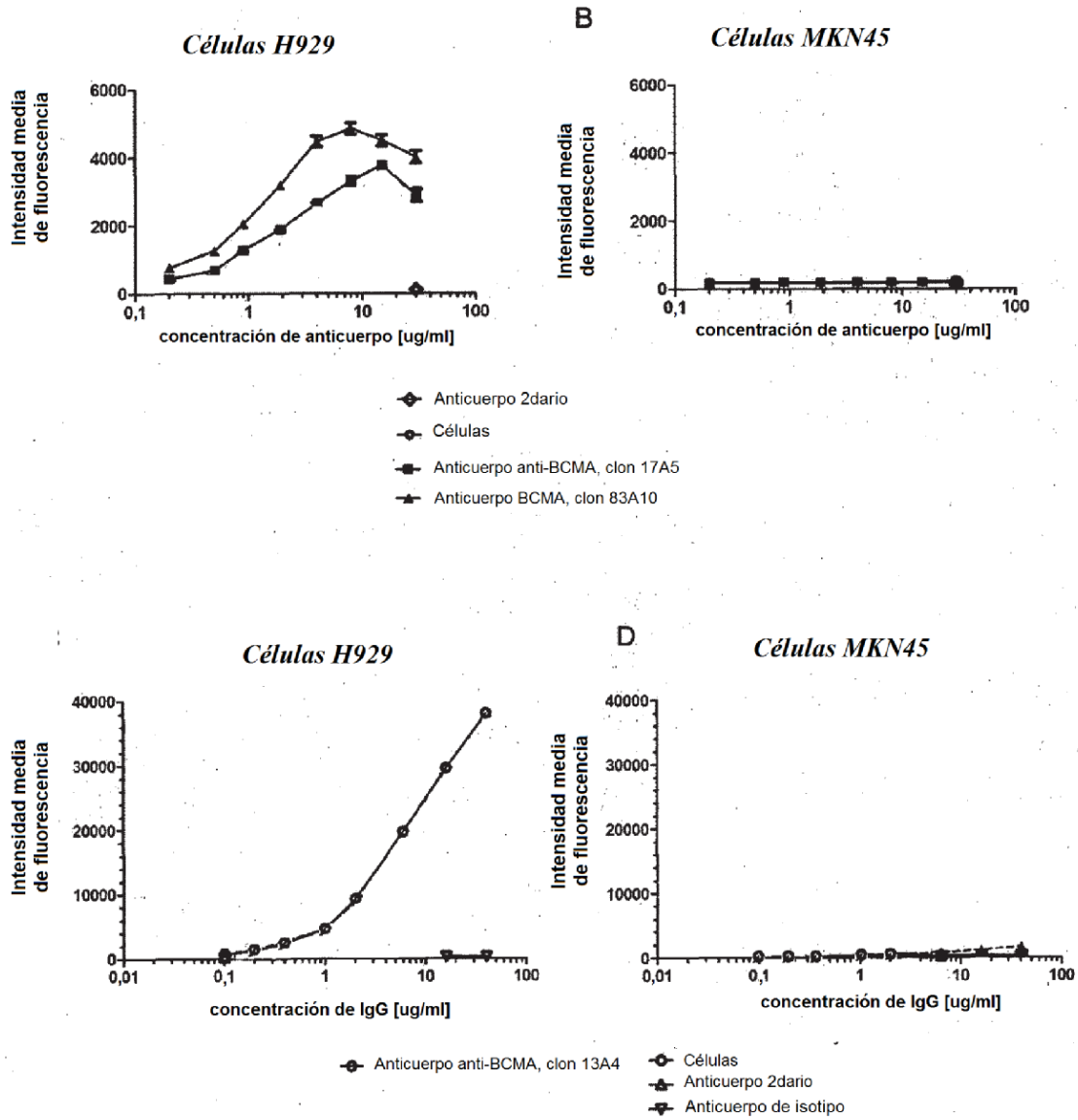


Fig. 5

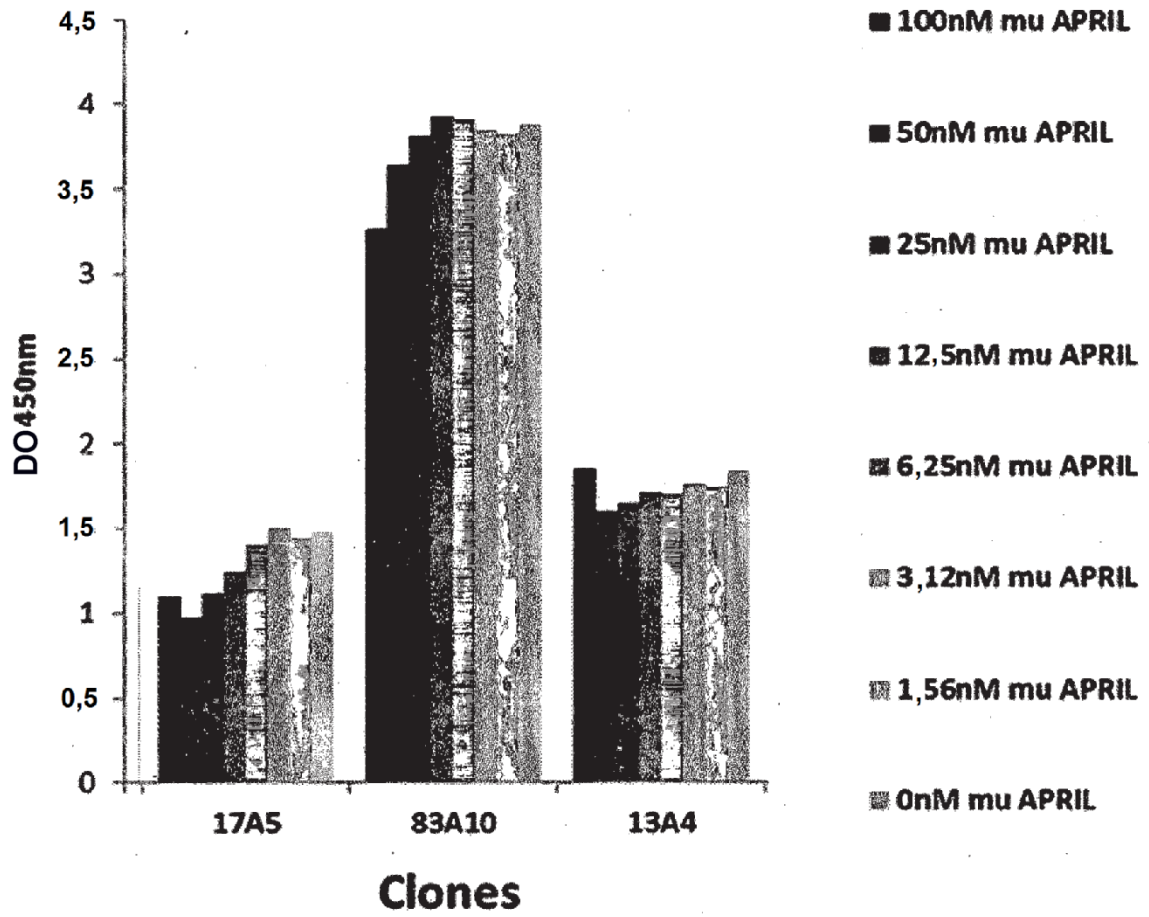


Fig. 6

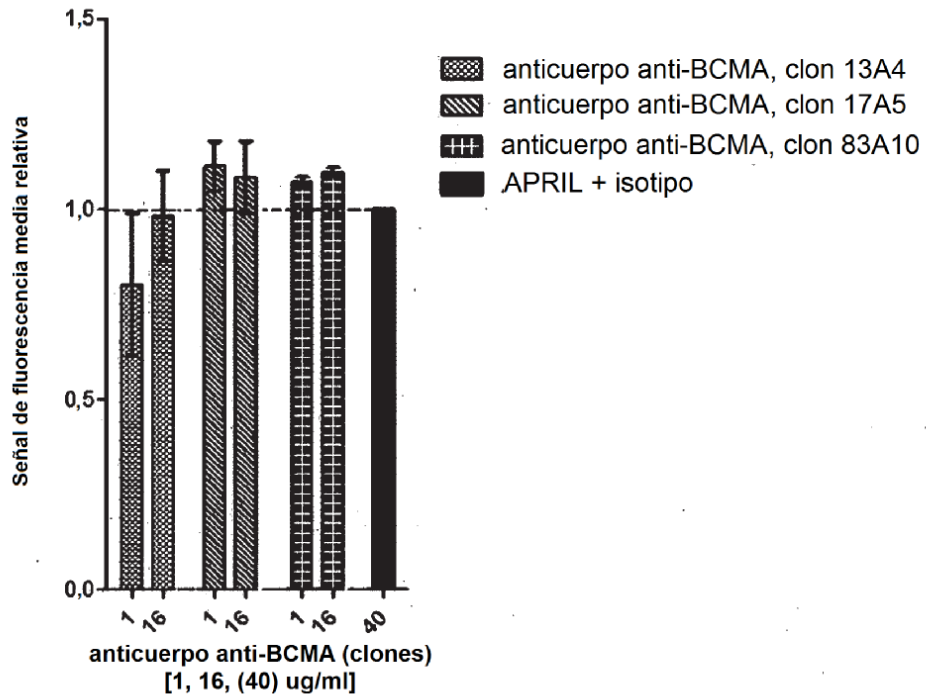


Fig. 7

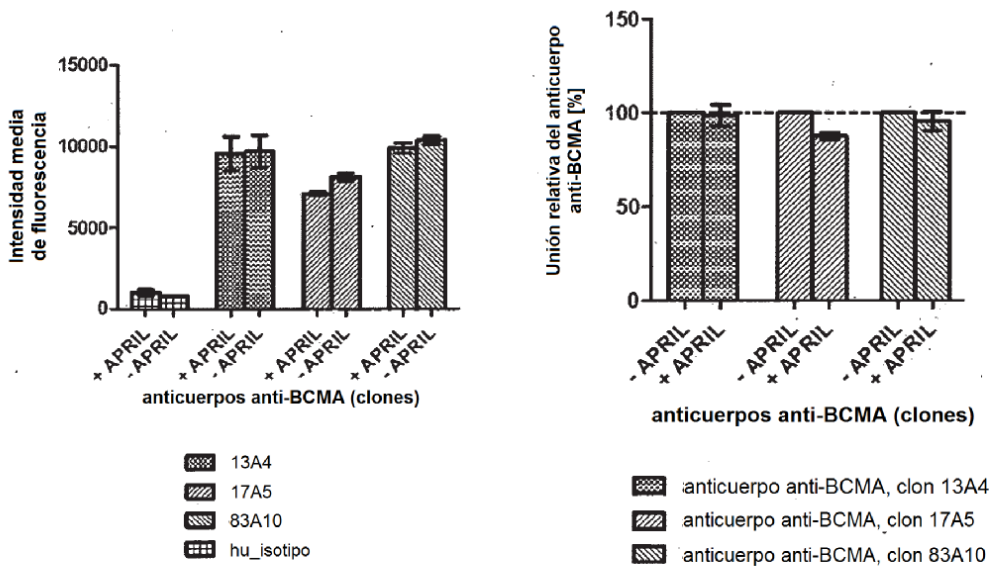


Fig. 8

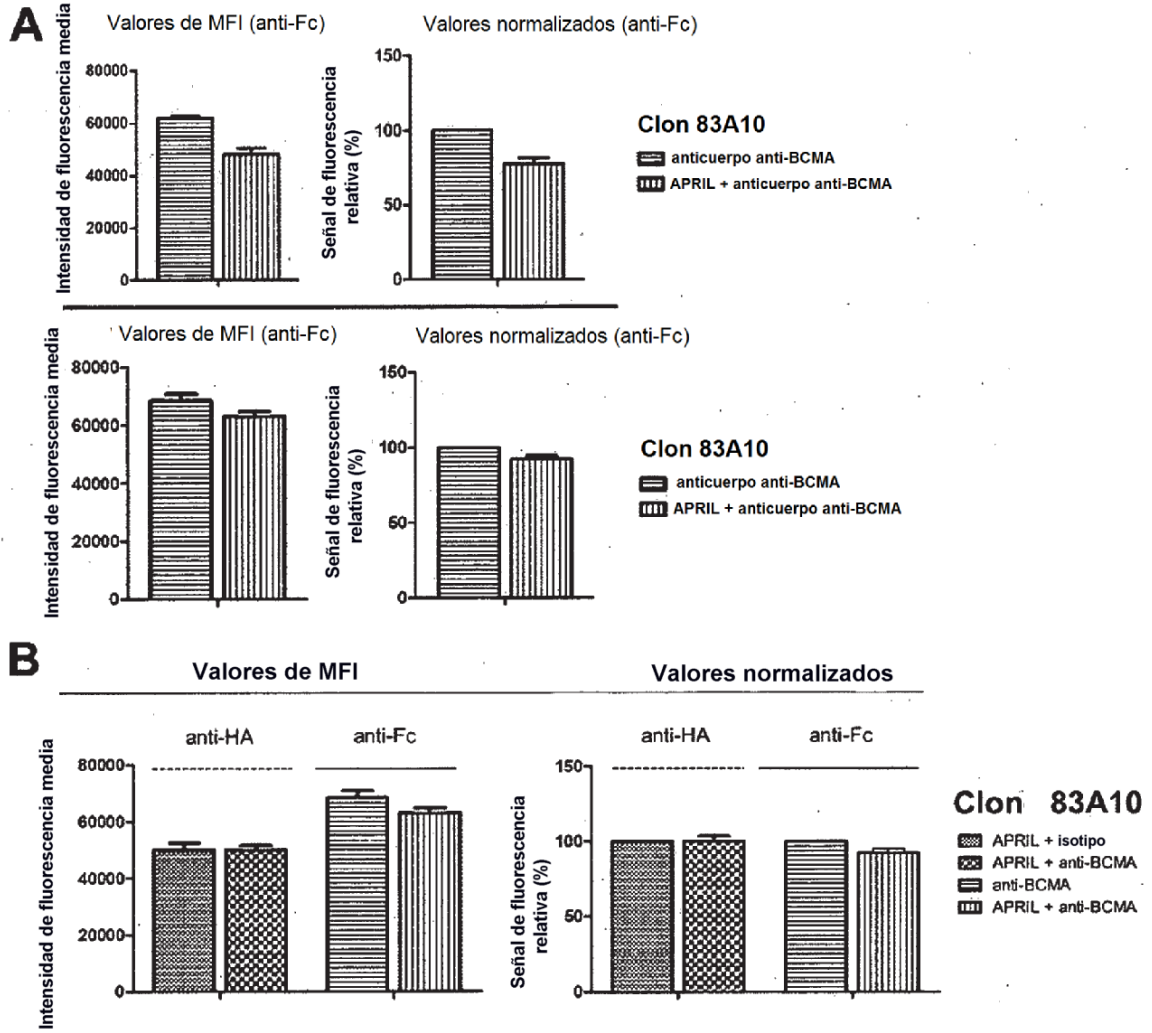




Fig. 9

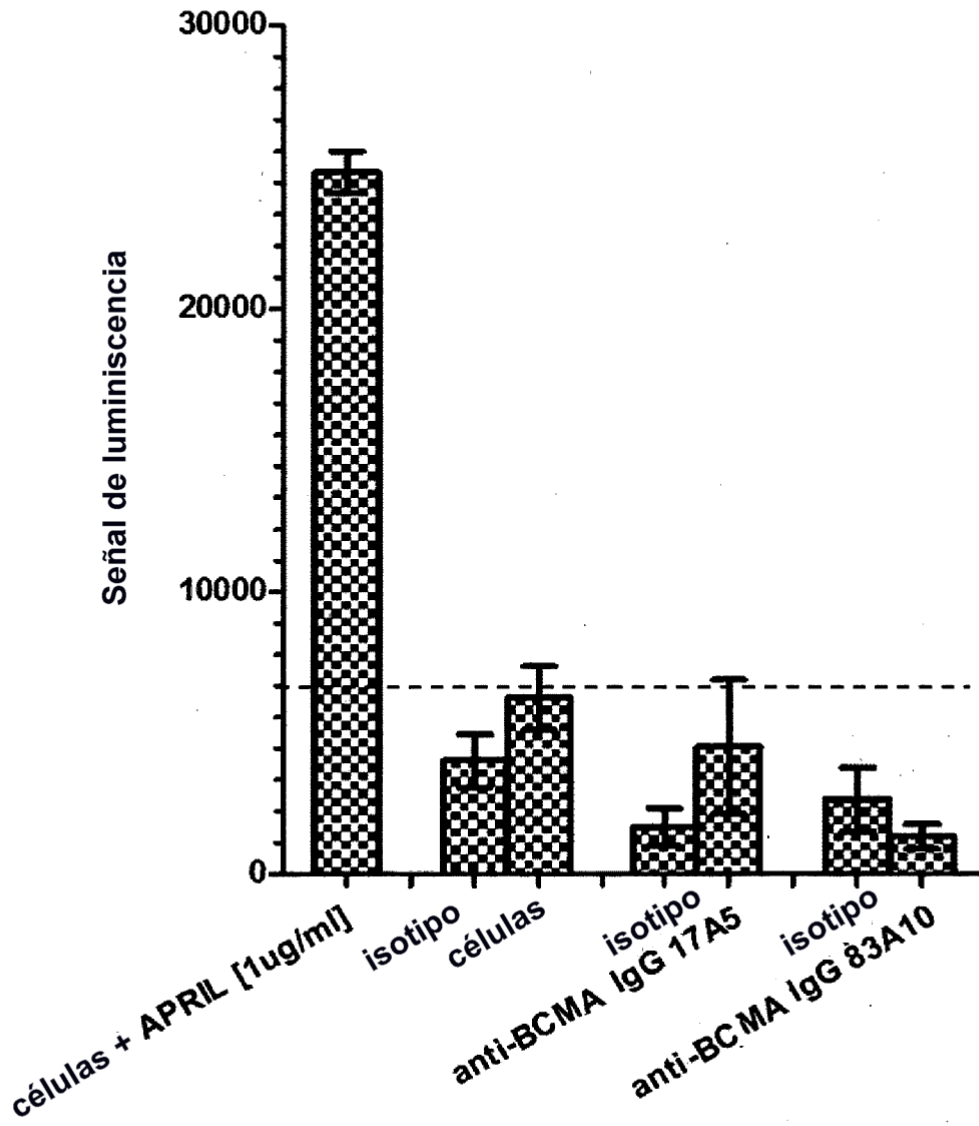
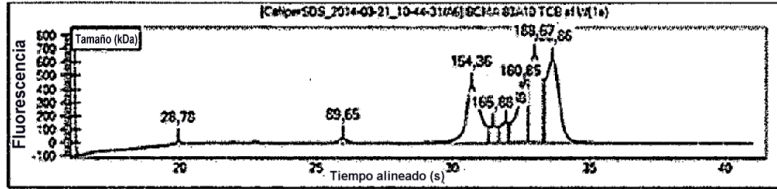


Fig. 10

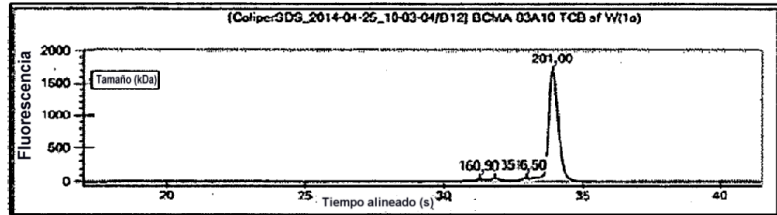
**A. 83A10-TCB**

Métodos Pur.: PA + SEC  
 Pureza: <30%  
 Rendimiento: 6,7 mg/l  
 Cantidad: 2,7 mg  
 Monómero: 82,8%



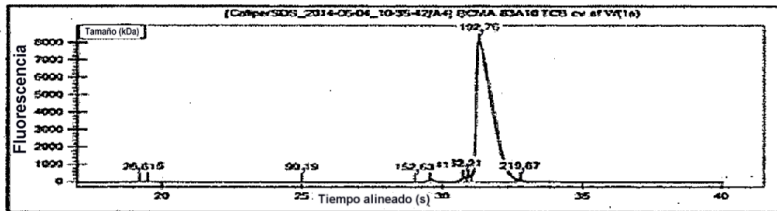
**B. 83A10-TCB**

Métodos Pur.: PA + SEC +  
 cIEX + re-SEC  
 Pureza: 93,4%  
 Rendimiento: 0,42 mg/l  
 Cantidad: 0,168 mg  
 Monómero: 82,8%



**C. 83A10-TCBcv**

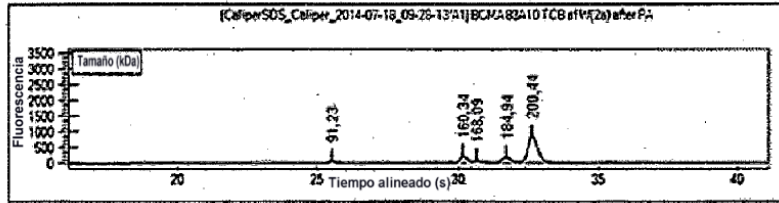
Métodos Pur.: PA + cIEX + SEC  
 Pureza: 95,3%  
 Rendimiento: 3,3 mg/l  
 Cantidad: 1,3 mg  
 Monómero: 100%



**Fig. 11**

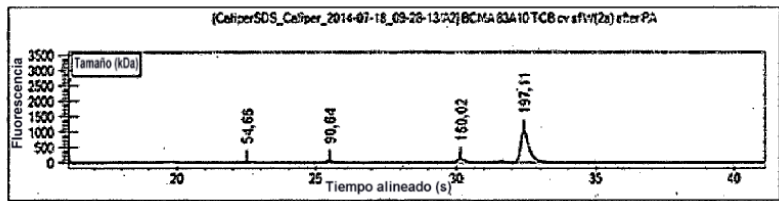
**A. 83A10-TCB**

Métodos Pur.: PA  
 Pureza: 61,3%  
 Rendimiento: 26,2 mg/l  
 Cantidad: 24,3 mg  
 Monómero: 63,7%  
 LC-MS: n.d.



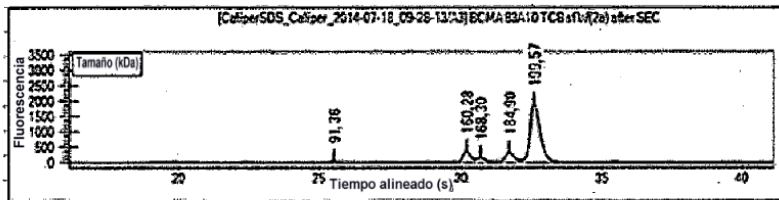
**B. 83A10-TCBcv**

Métodos Pur.: PA  
 Pureza: 81,0%  
 Rendimiento: 51,5 mg/l  
 Cantidad: 50,2 mg  
 Monómero: 68,2%  
 LC-MS: n.d.



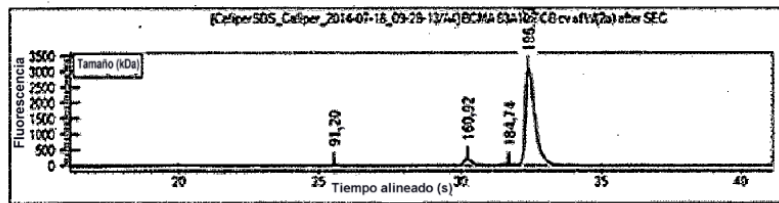
**C. 83A10-TCB**

Métodos Pur.: PA + SEC  
 Pureza: 69,5%  
 Rendimiento: 14,1 mg/l  
 Cantidad: 13,1 mg  
 Monómero: 74,7%  
 LC-MS: 40-60% molécula correcta



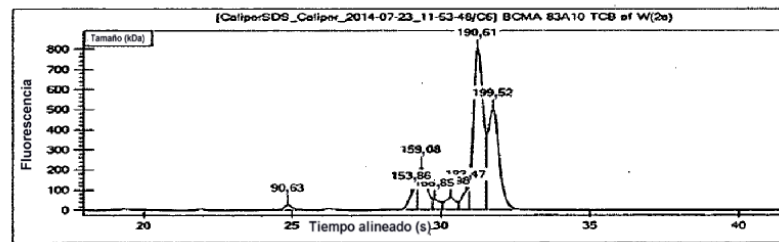
**D. 83A10-TCBcv**

Métodos Pur.: PA + SEC  
 Pureza: 91,0%  
 Rendimiento: 10,3 mg/l  
 Cantidad: 10,0 mg  
 Monómero: 83,9%  
 LC-MS: 90% molécula correcta



**E. 83A10-ICB**

Métodos Pur.: [(PA+SEC)+(PA)] + cIEX + SEC  
 Pureza: 43,1%  
 Rendimiento: 0,43 mg/l  
 Cantidad: 0,73 mg  
 Monómero: 98,3%  
 LC-MS: 60-70% molécula correcta



**F. 83A10-TCBcv**

Métodos Pur.: [(PA+SEC)+(PA)] + cIEX + SEC  
 Pureza: 96,2%  
 Rendimiento: 0,64 mg/l  
 Cantidad: 1,27 mg  
 Monómero: 98,9%  
 LC-MS: >95% molécula correcta

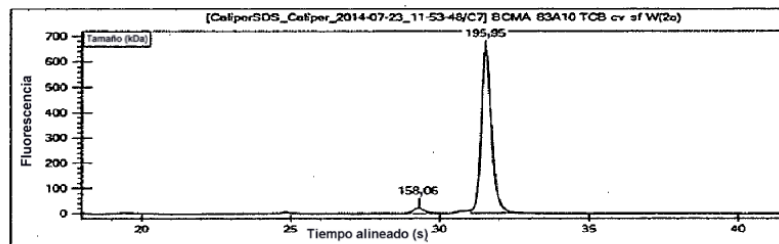


Fig. 12

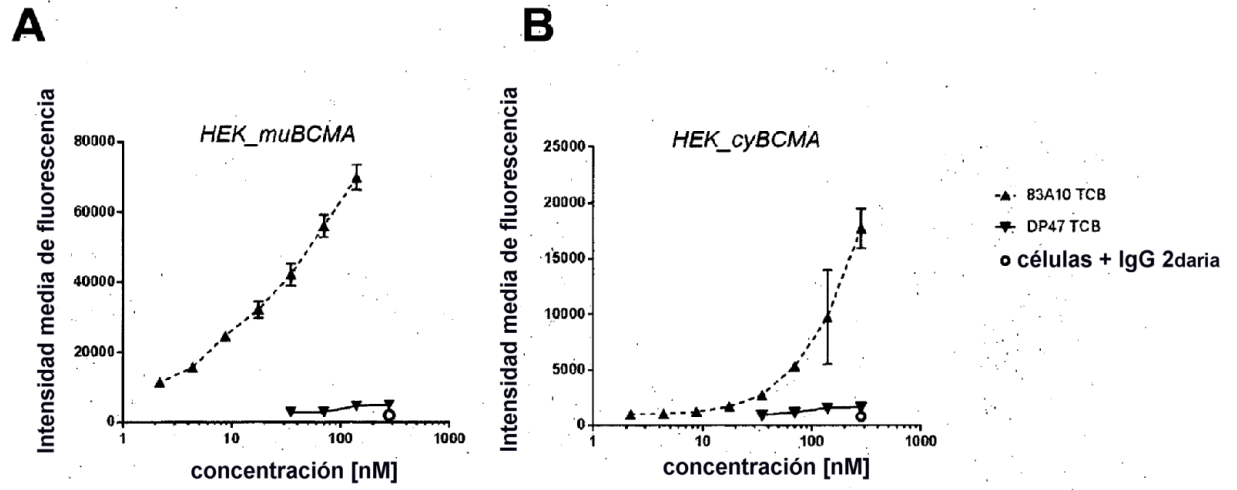
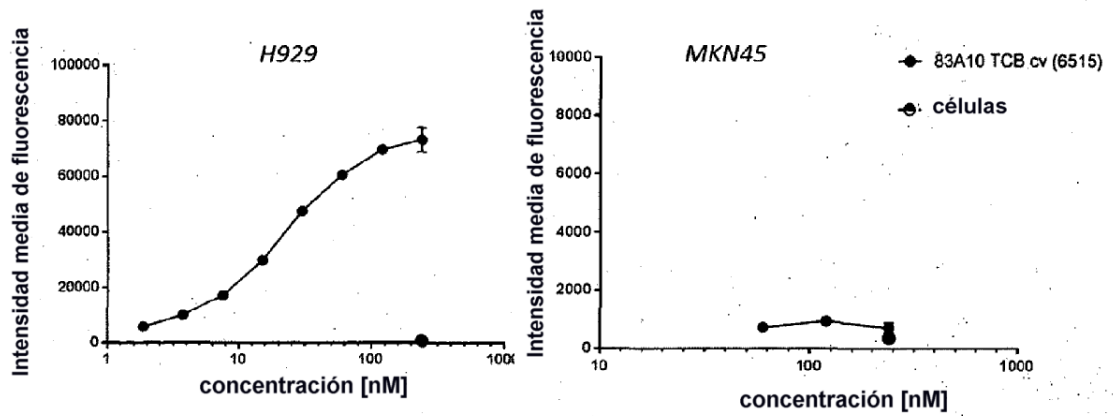


Fig. 13

**A**



**B**

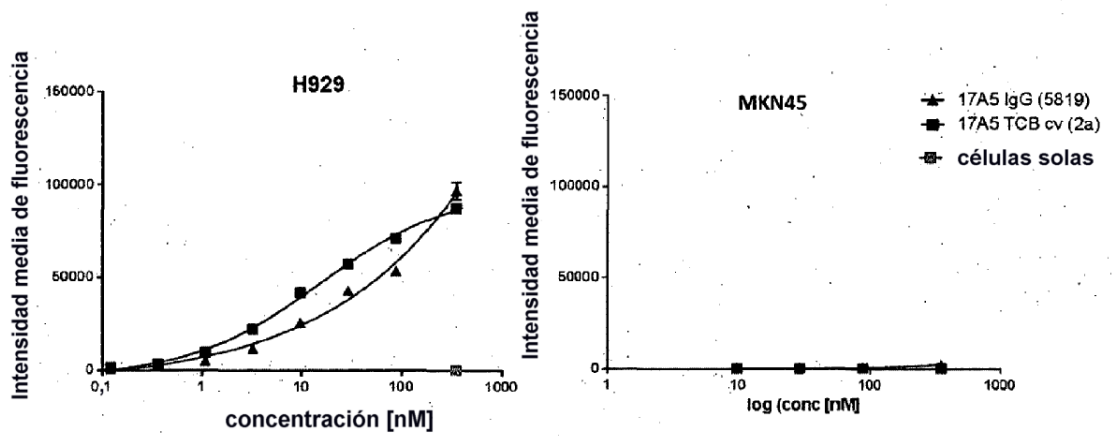
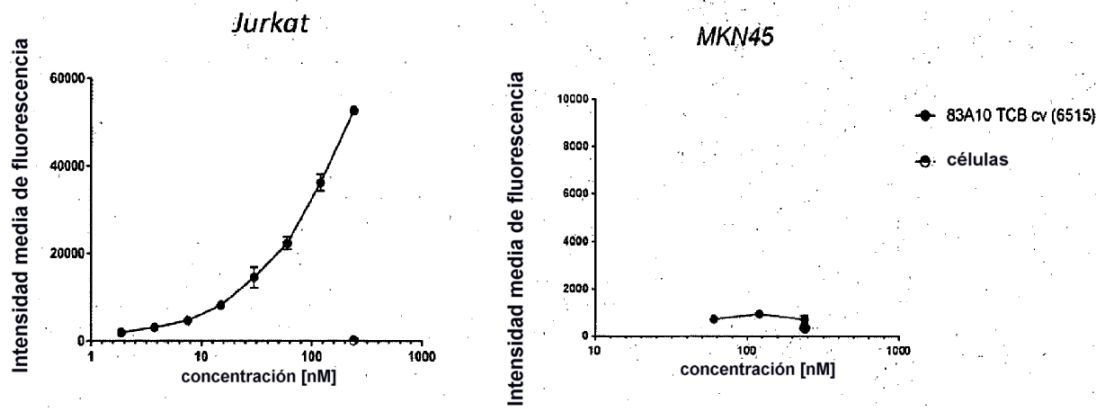


Fig. 14

**A**



**B**

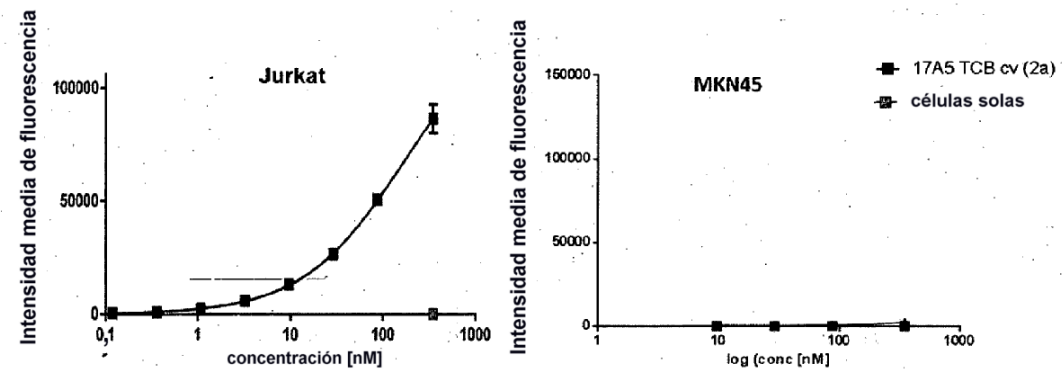
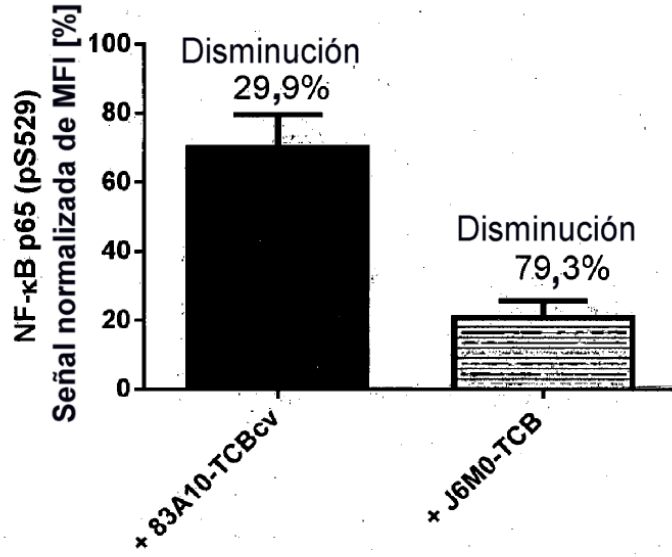


Fig. 15

**A**



**B**

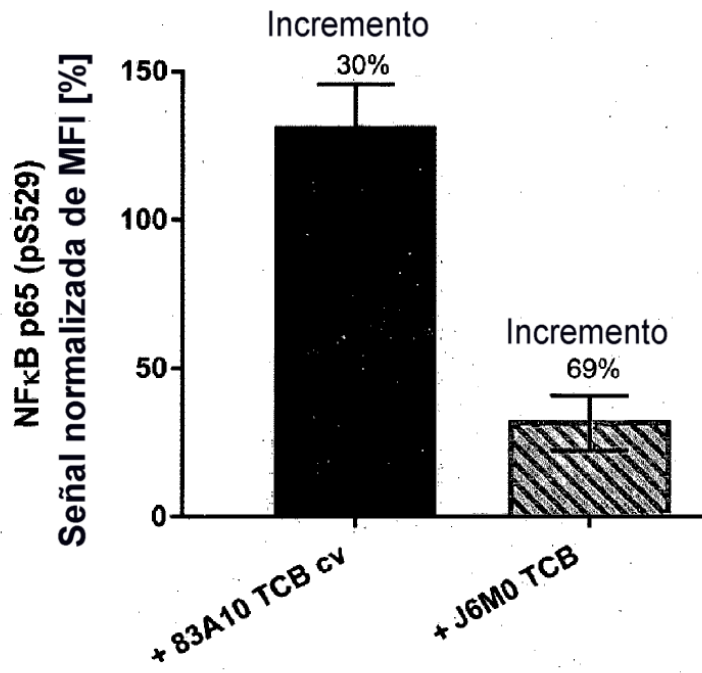
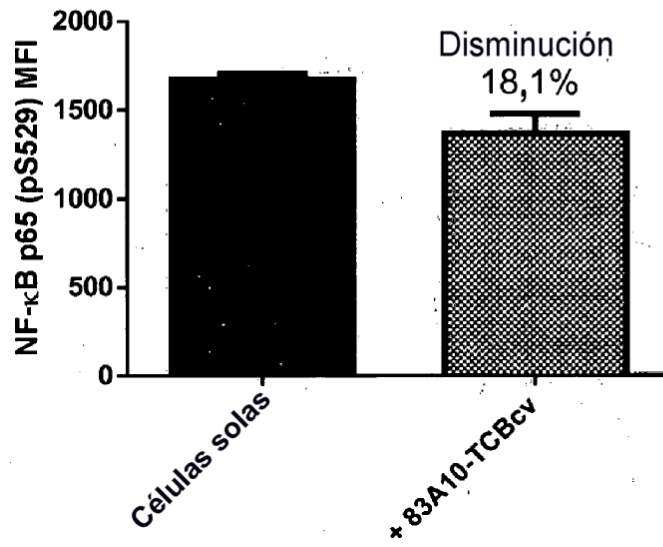


Fig. 16

**A**



**B**

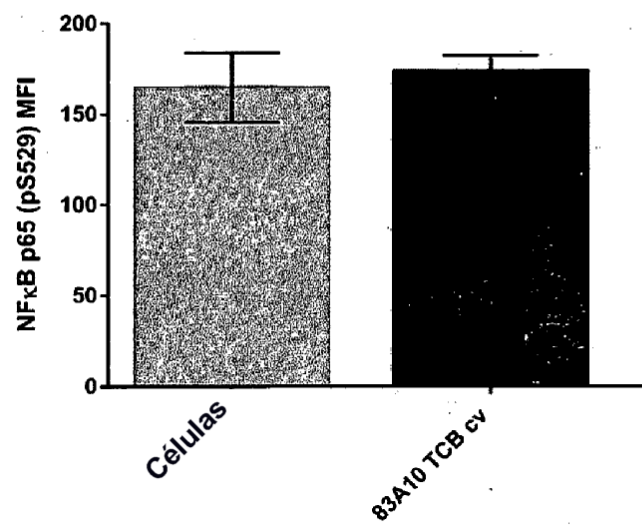




Fig. 17

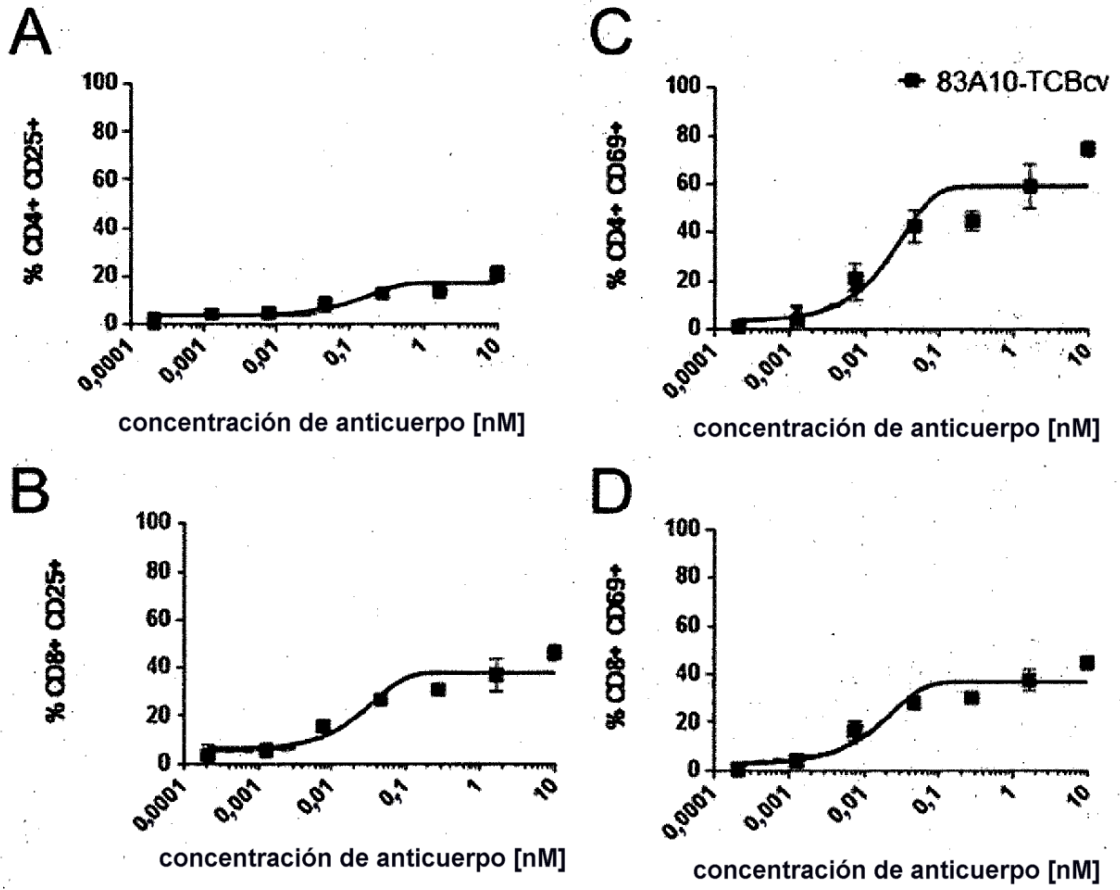


Fig. 18

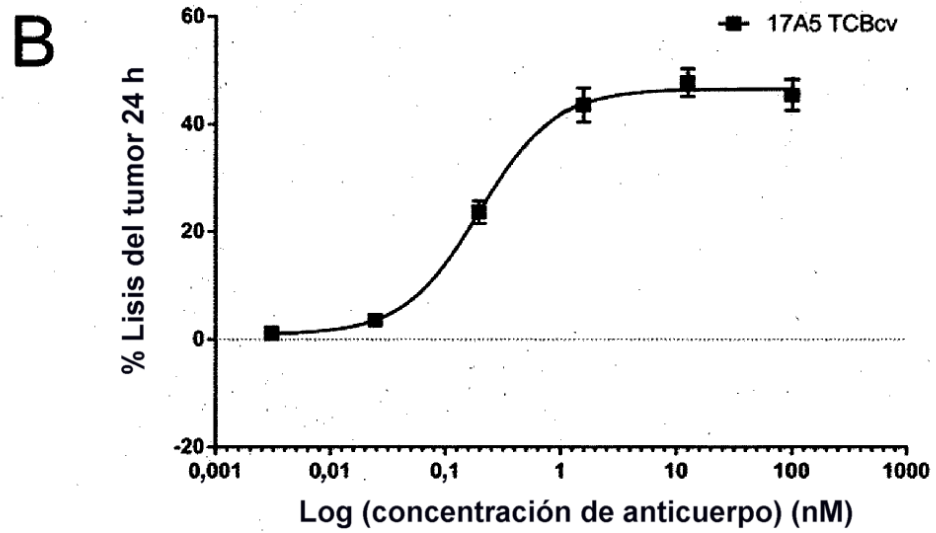
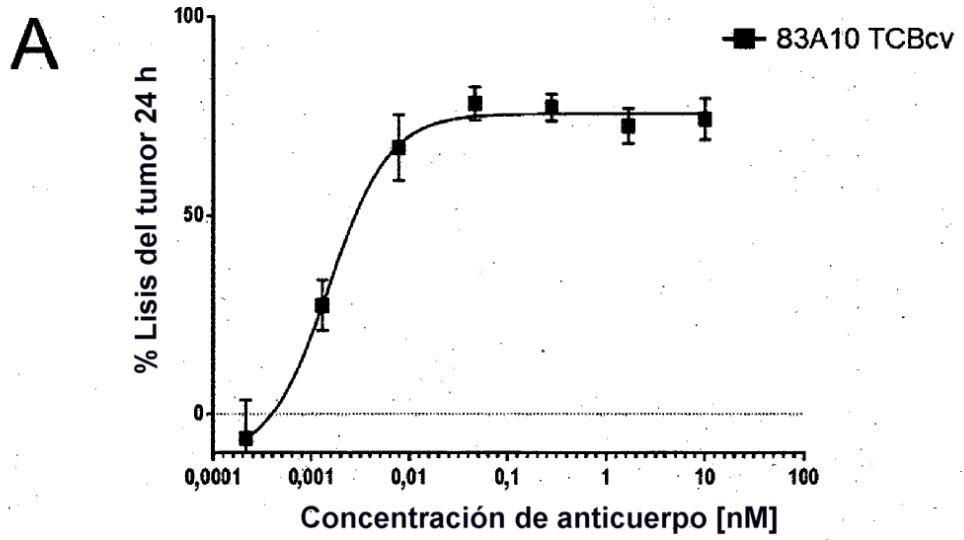


Fig. 18-1

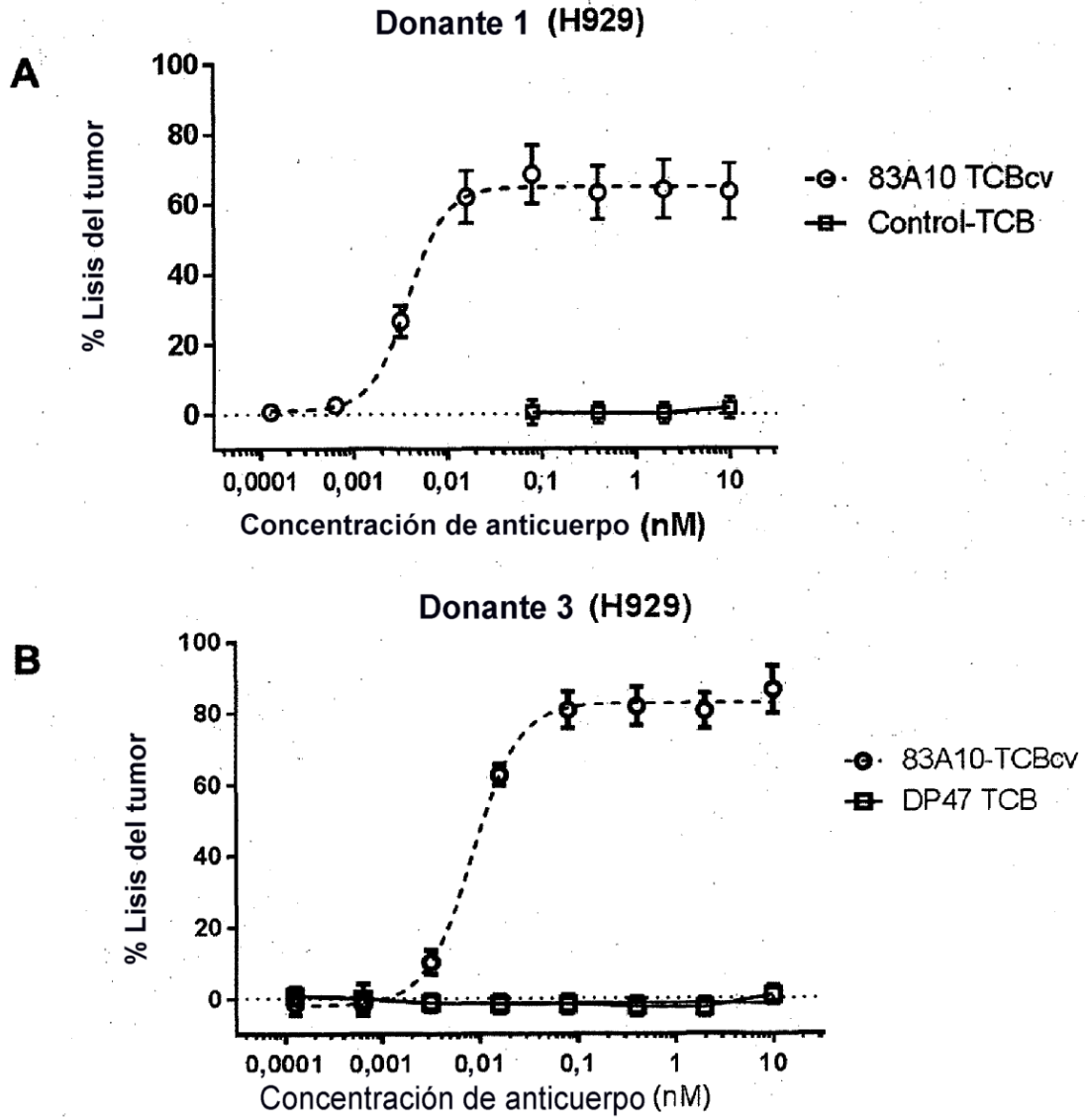


Fig. 18-1

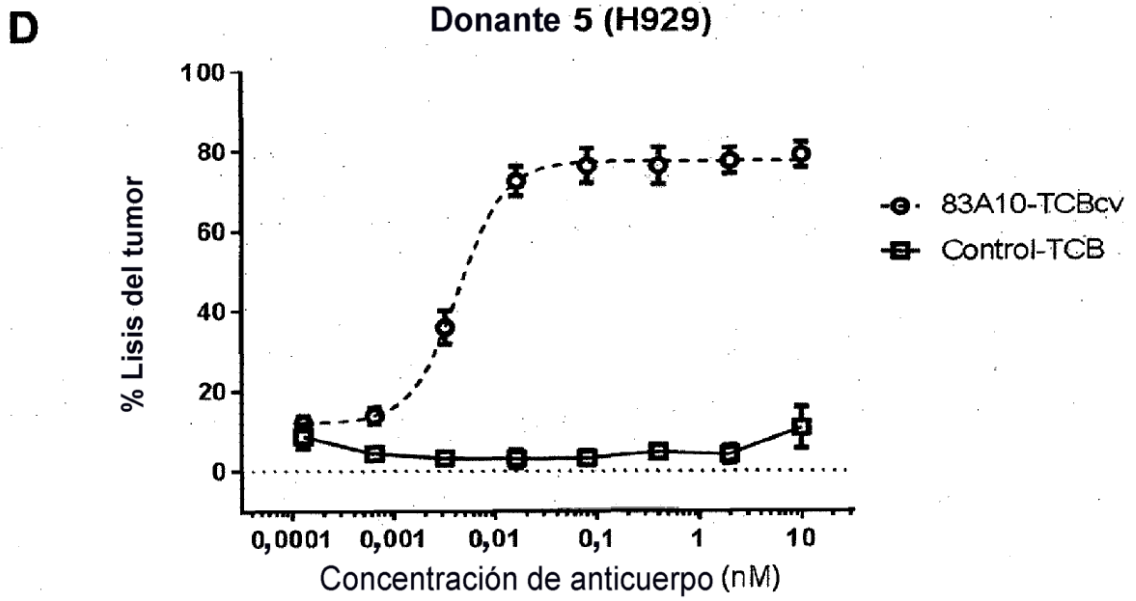
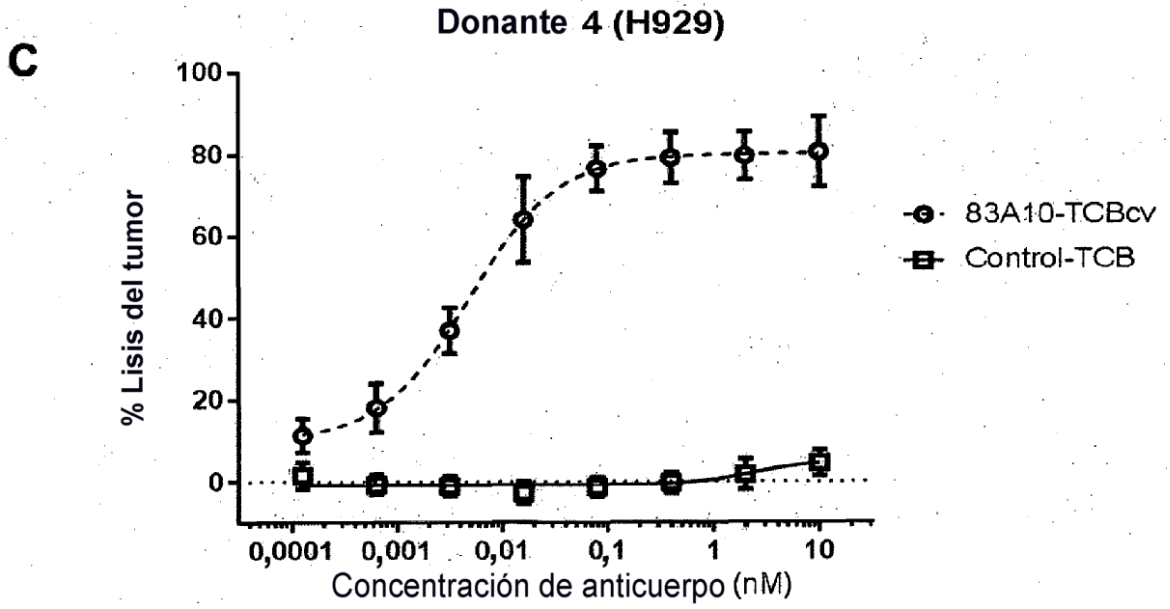


Fig. 18-2

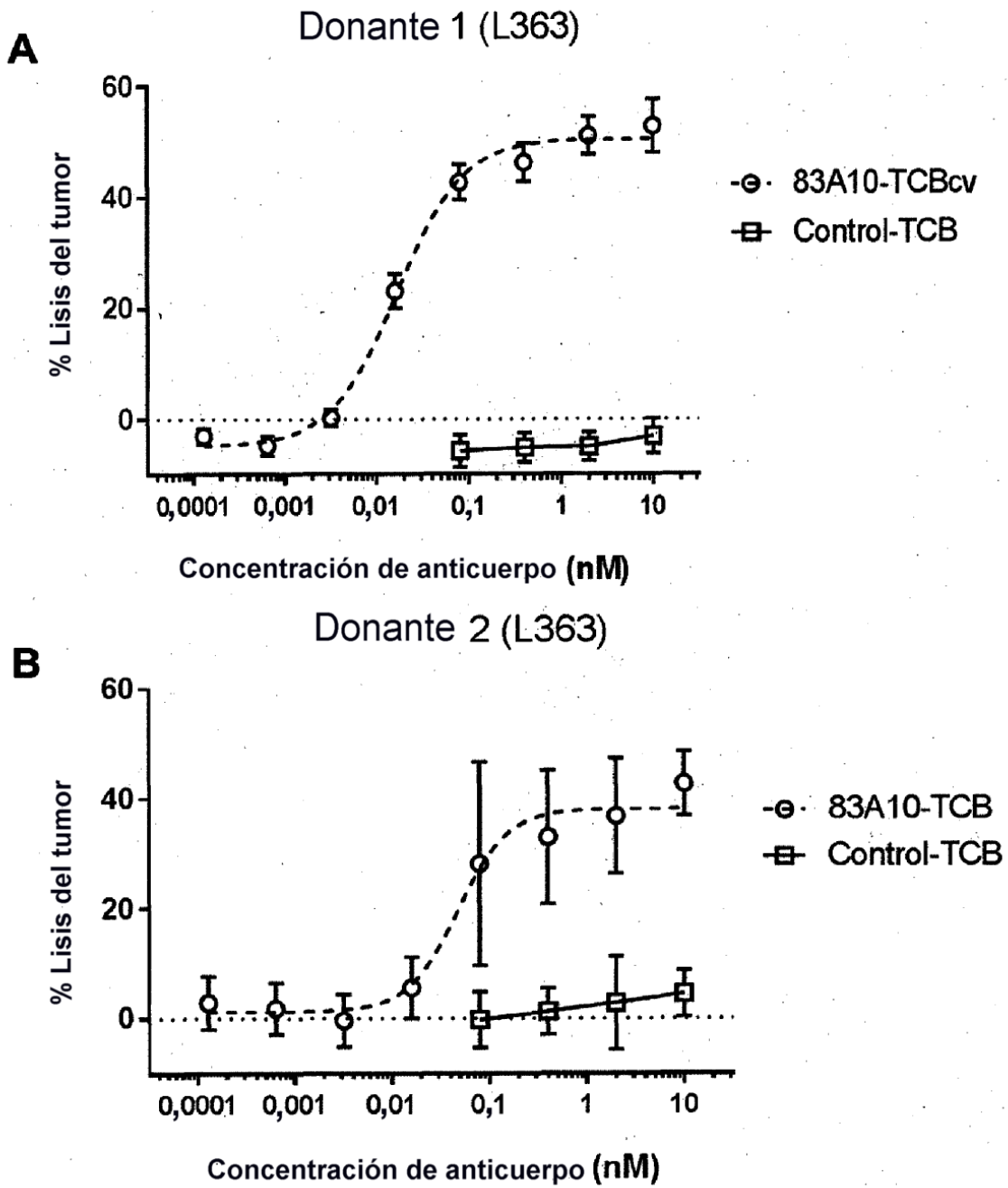


Fig. 18-2

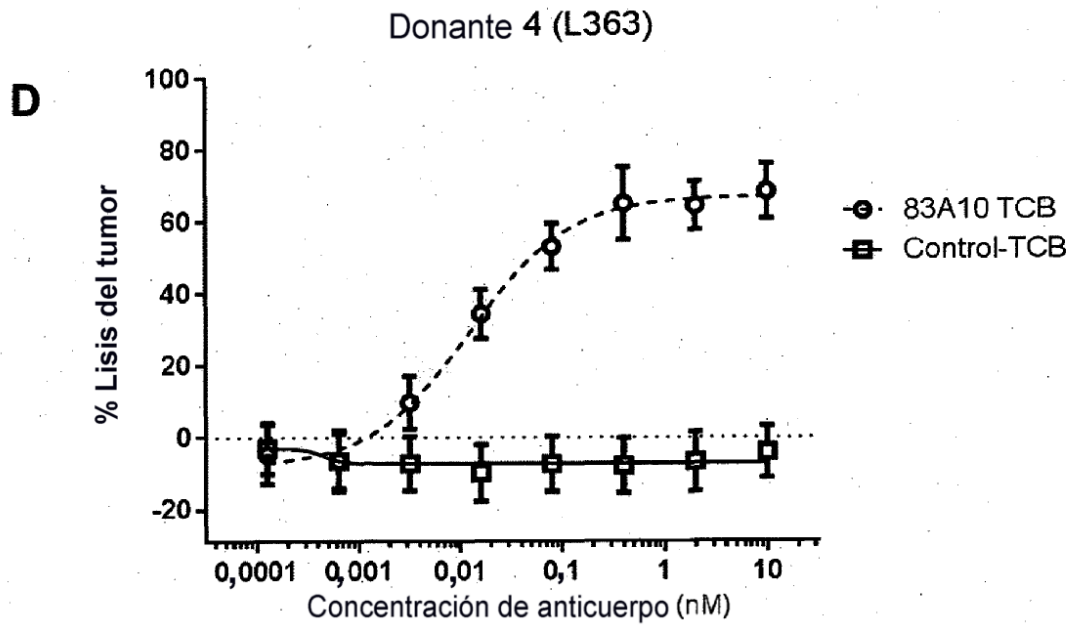
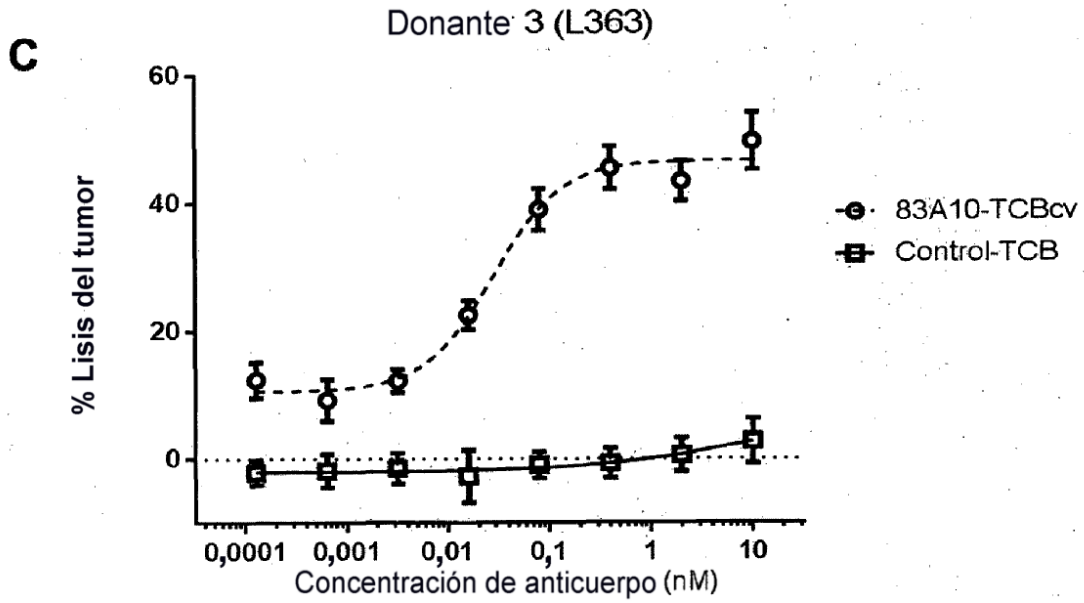


Fig. 18-2

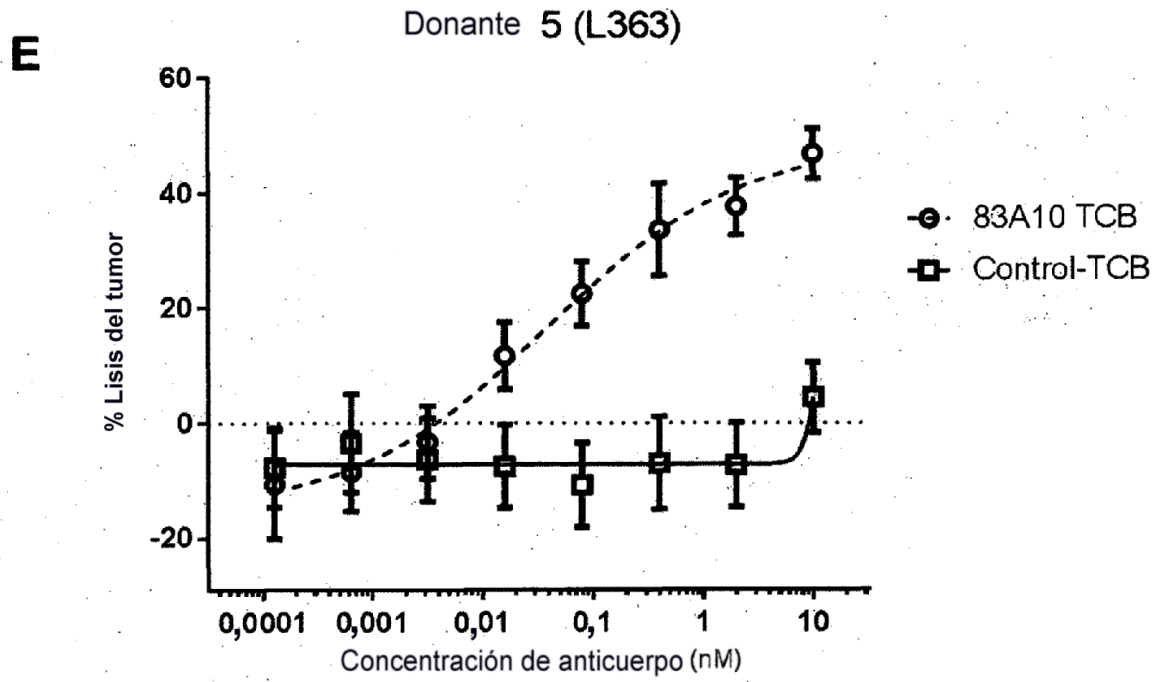


Fig. 18-3

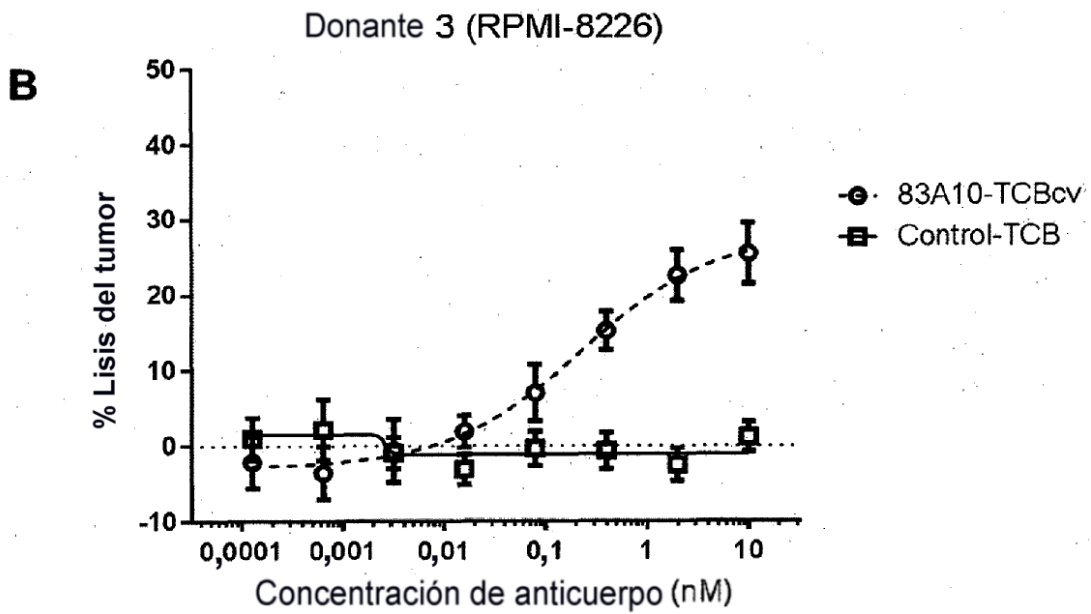
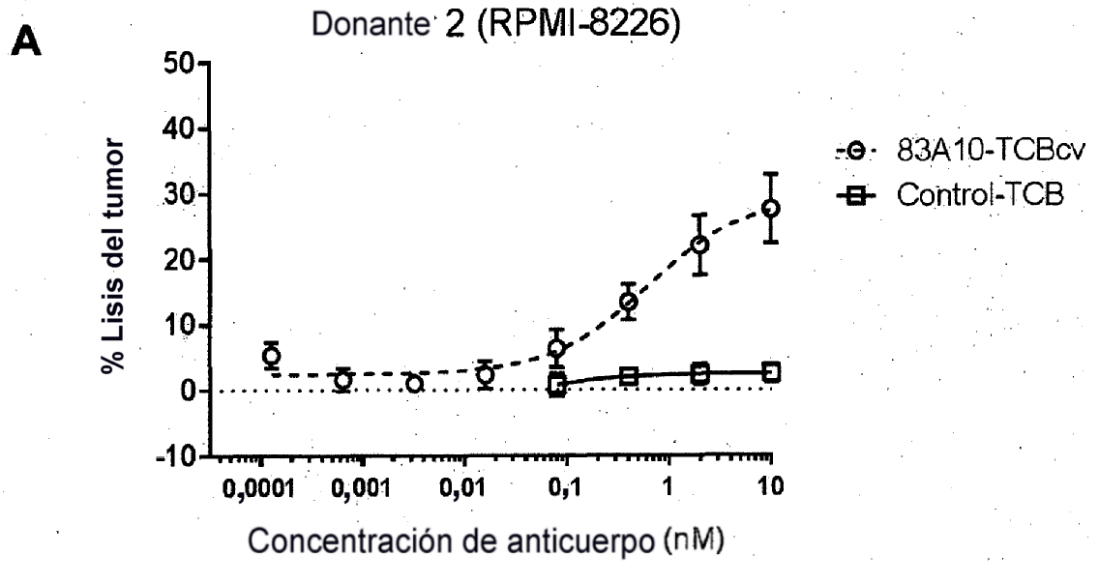
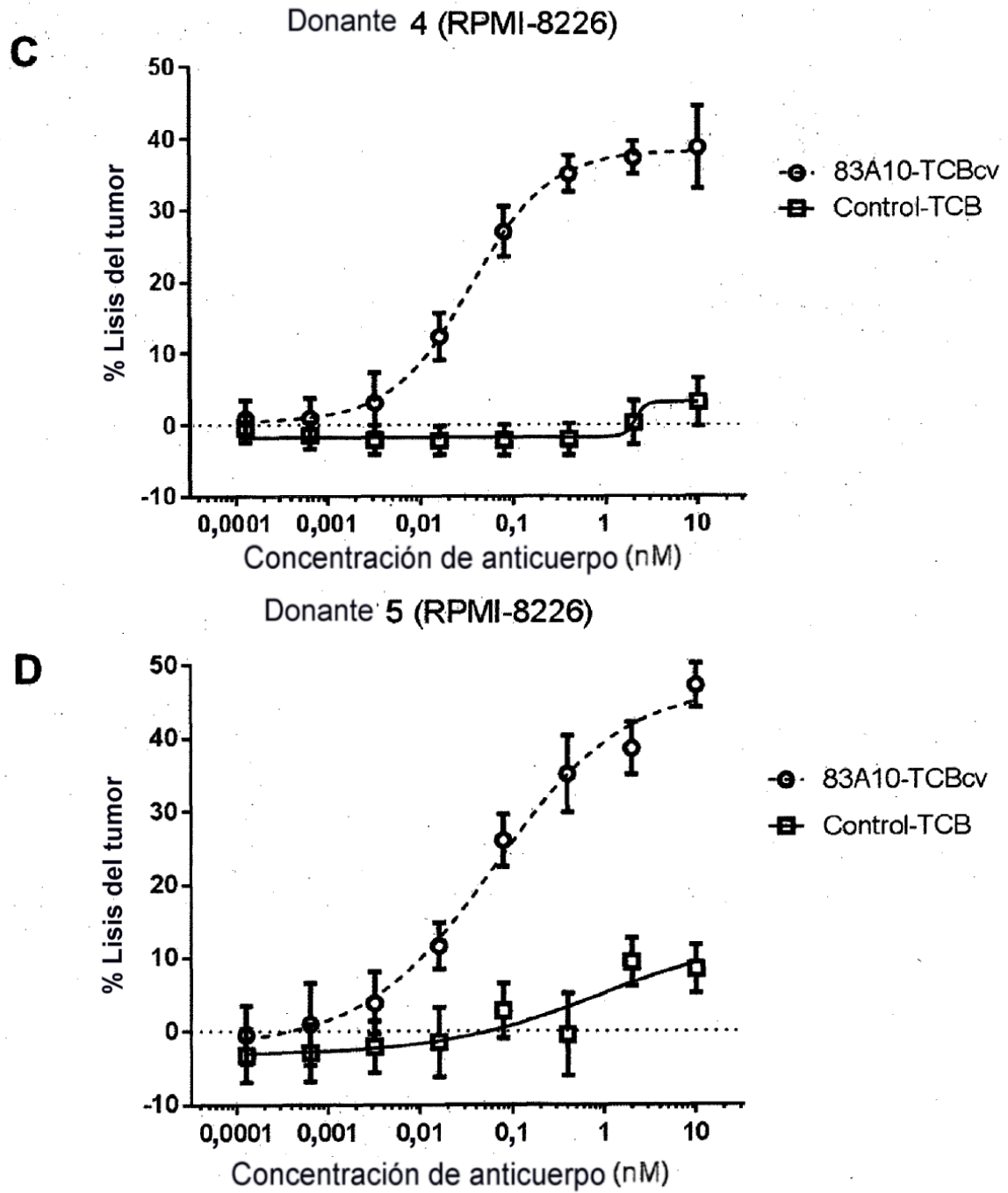




Fig. 18-3



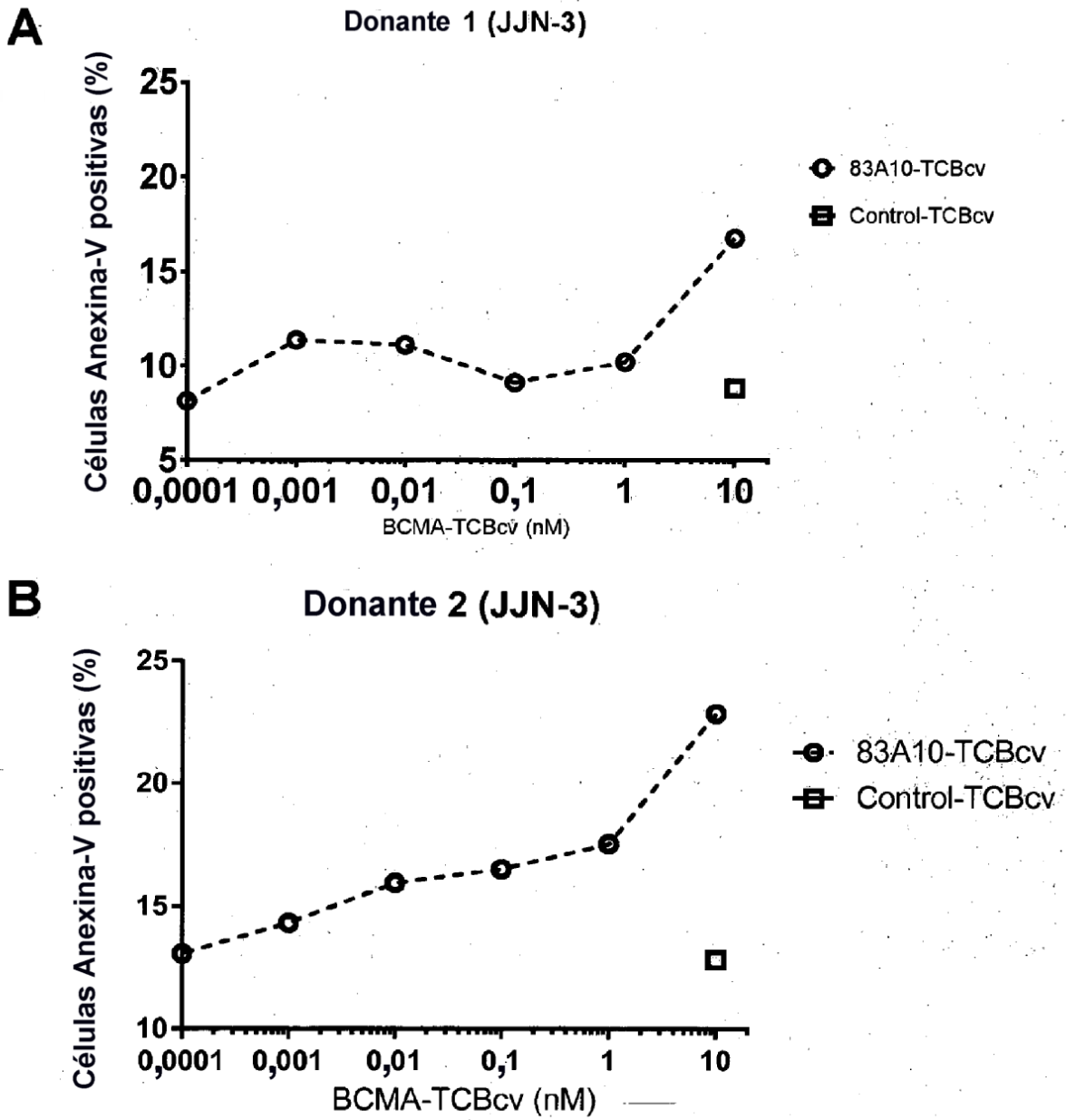


Fig. 18-4

Fig. 18-4

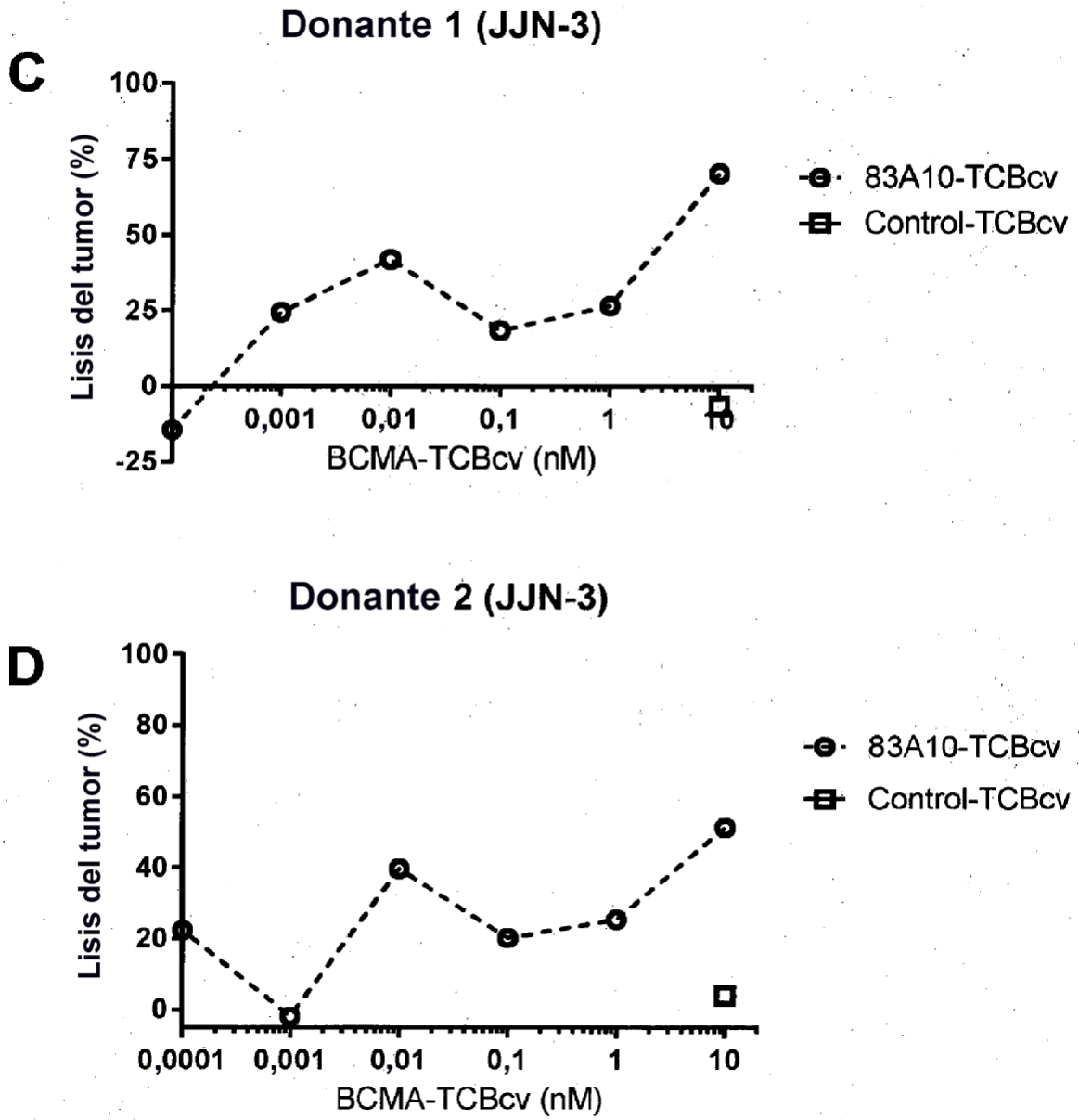


Fig. 19

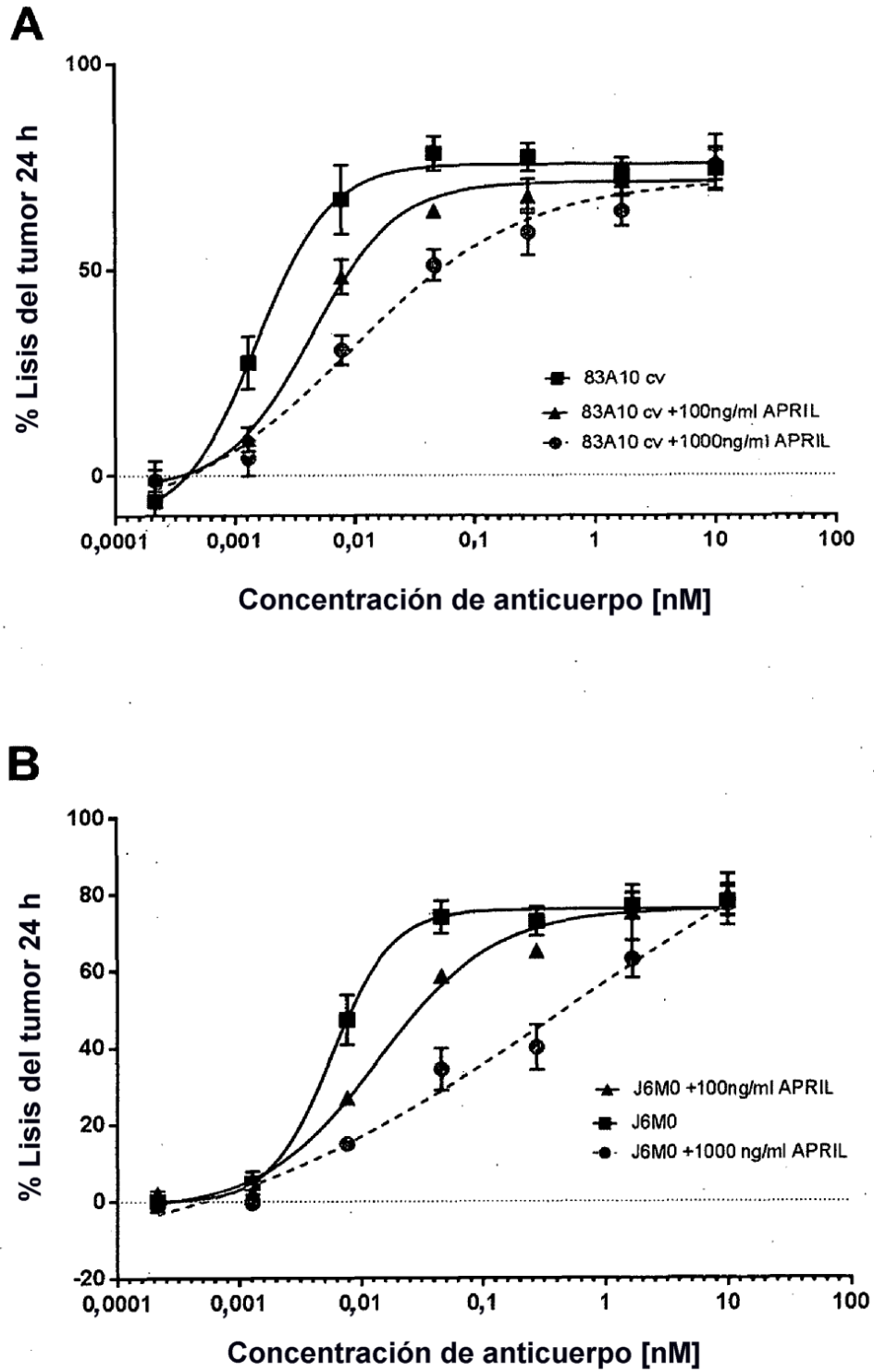
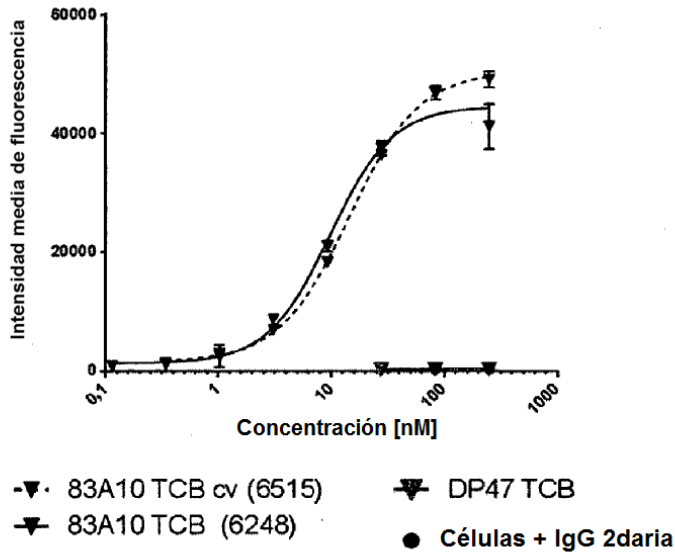


Fig. 20

A



B

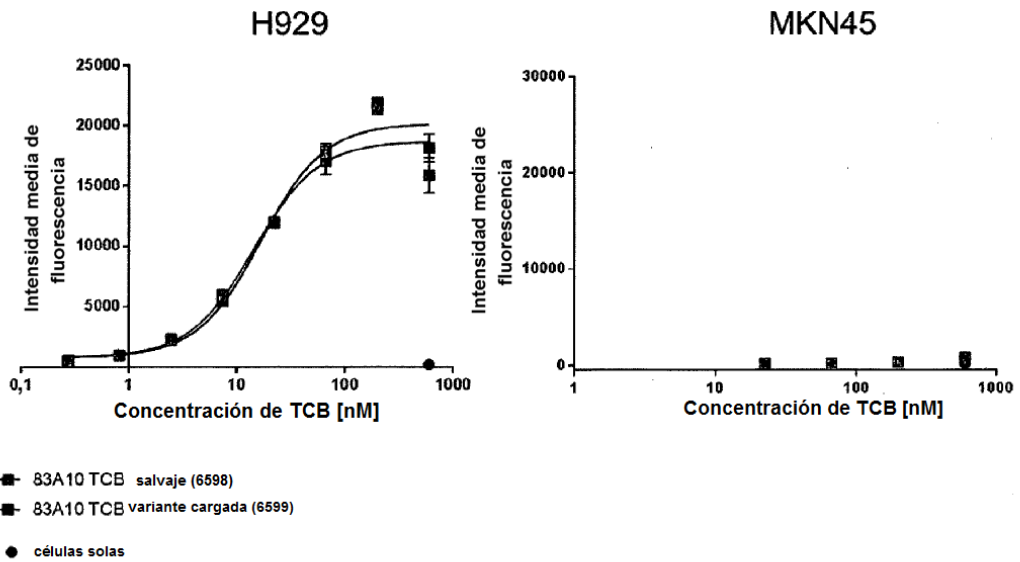


Fig. 20

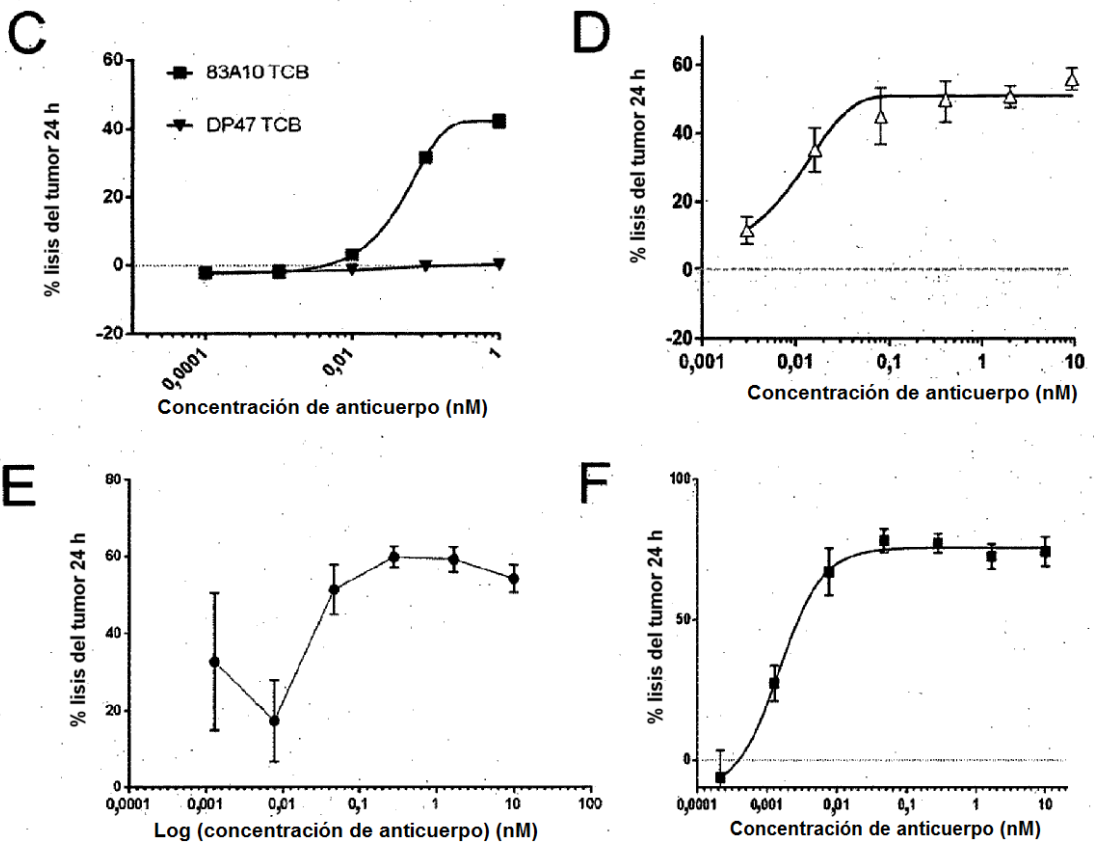


Fig.21

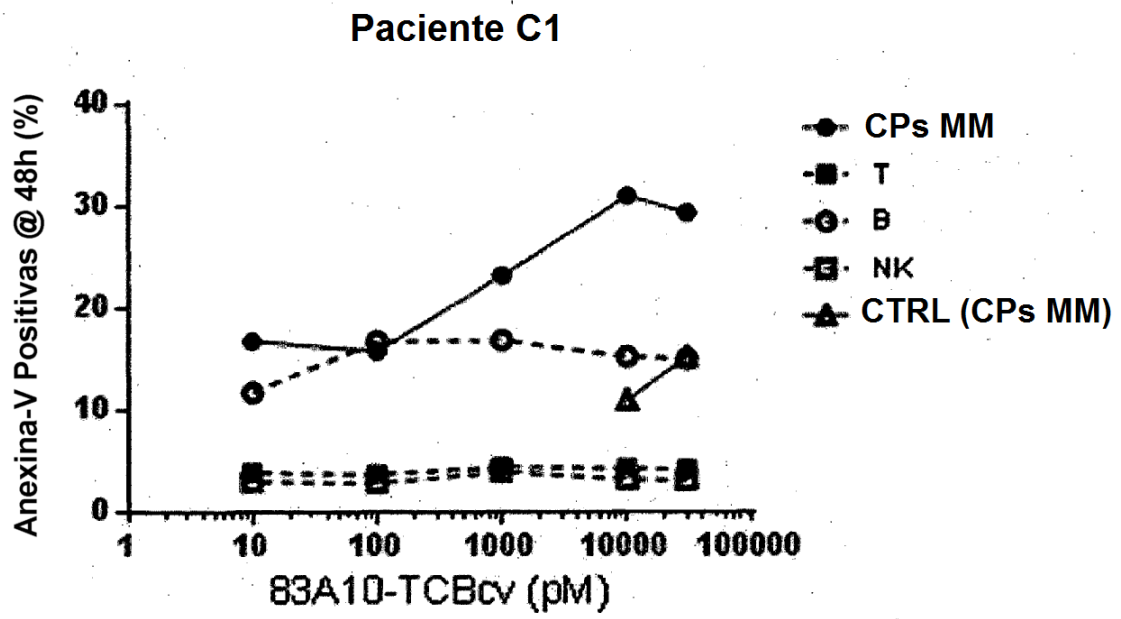


Fig.22

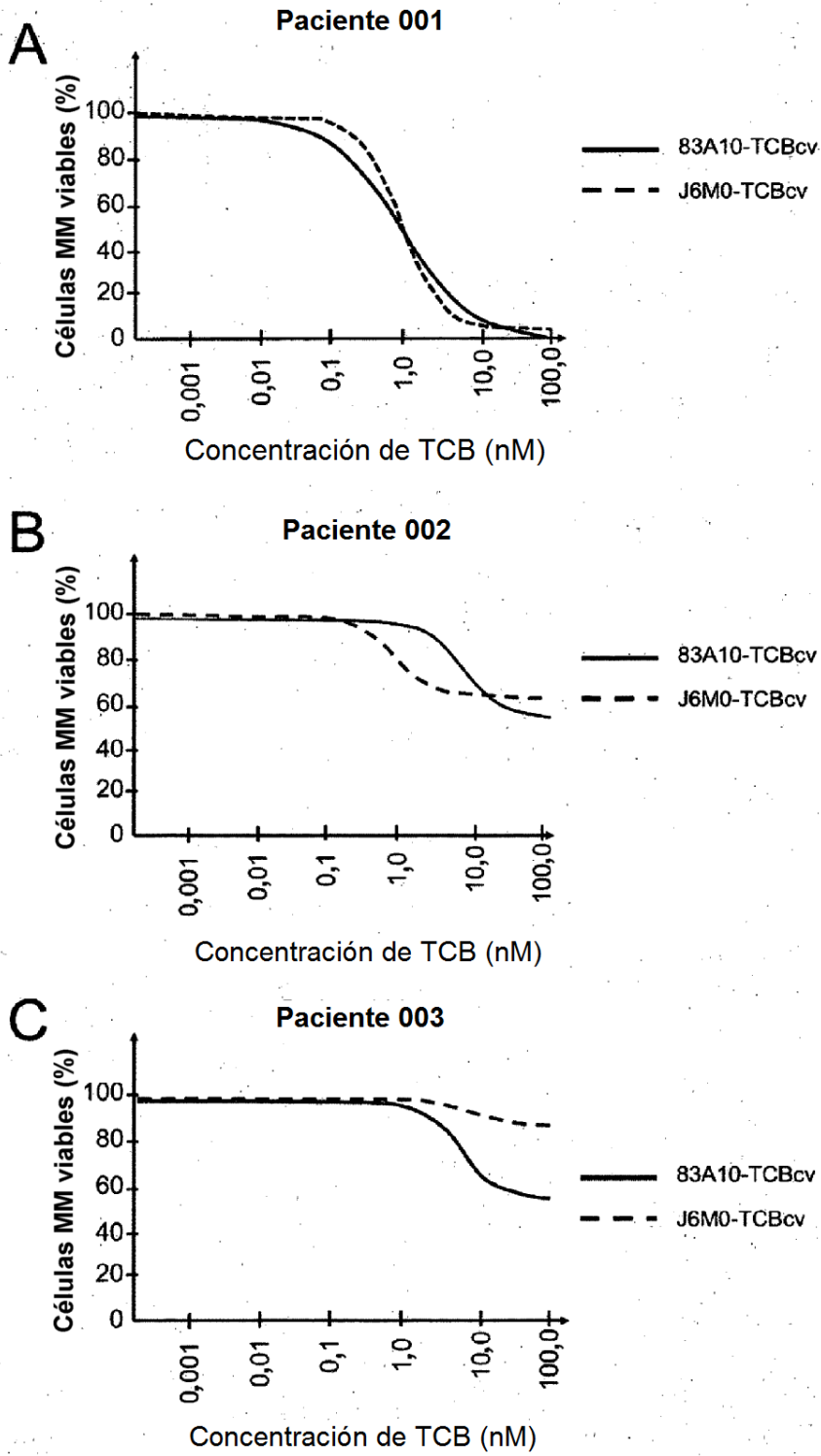




Fig. 23

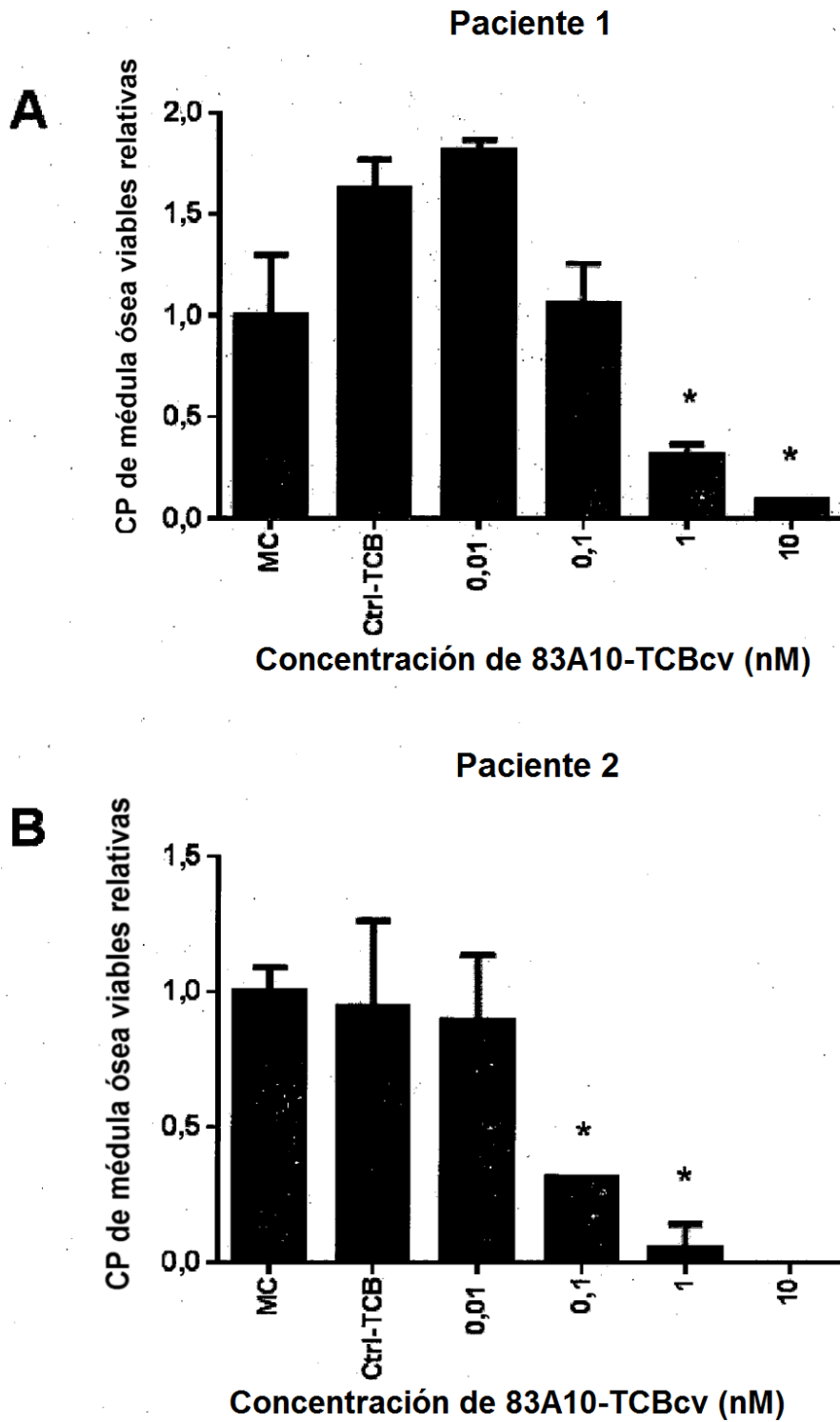


Fig. 23

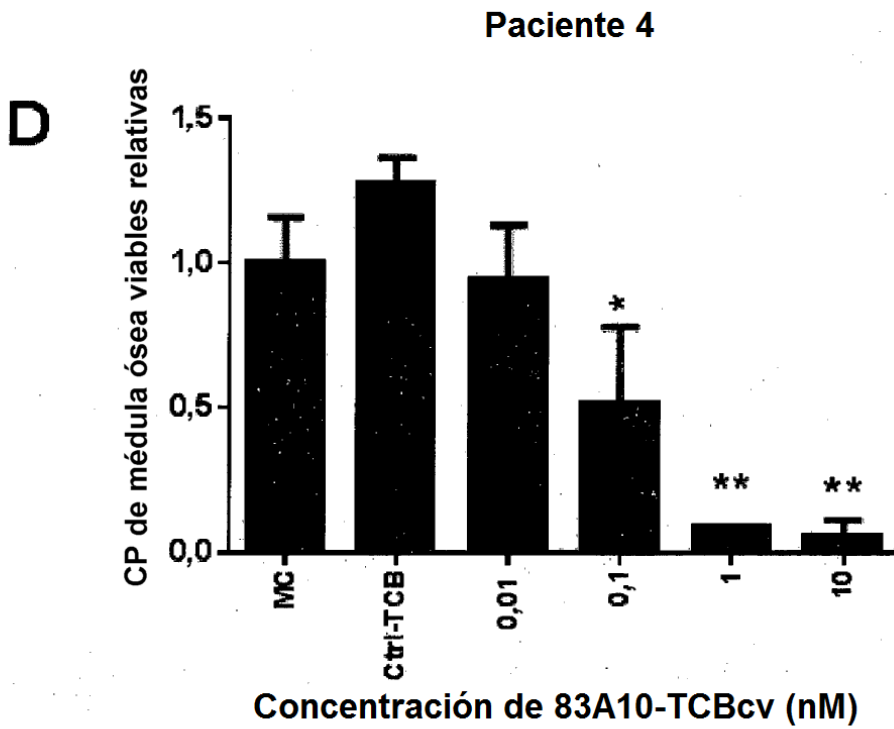
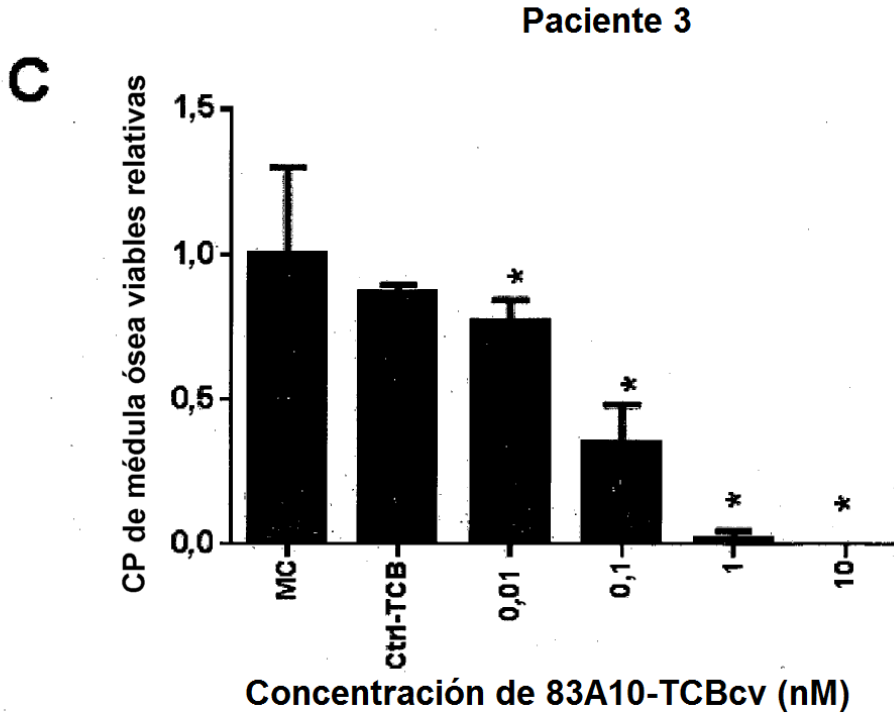


Fig. 23

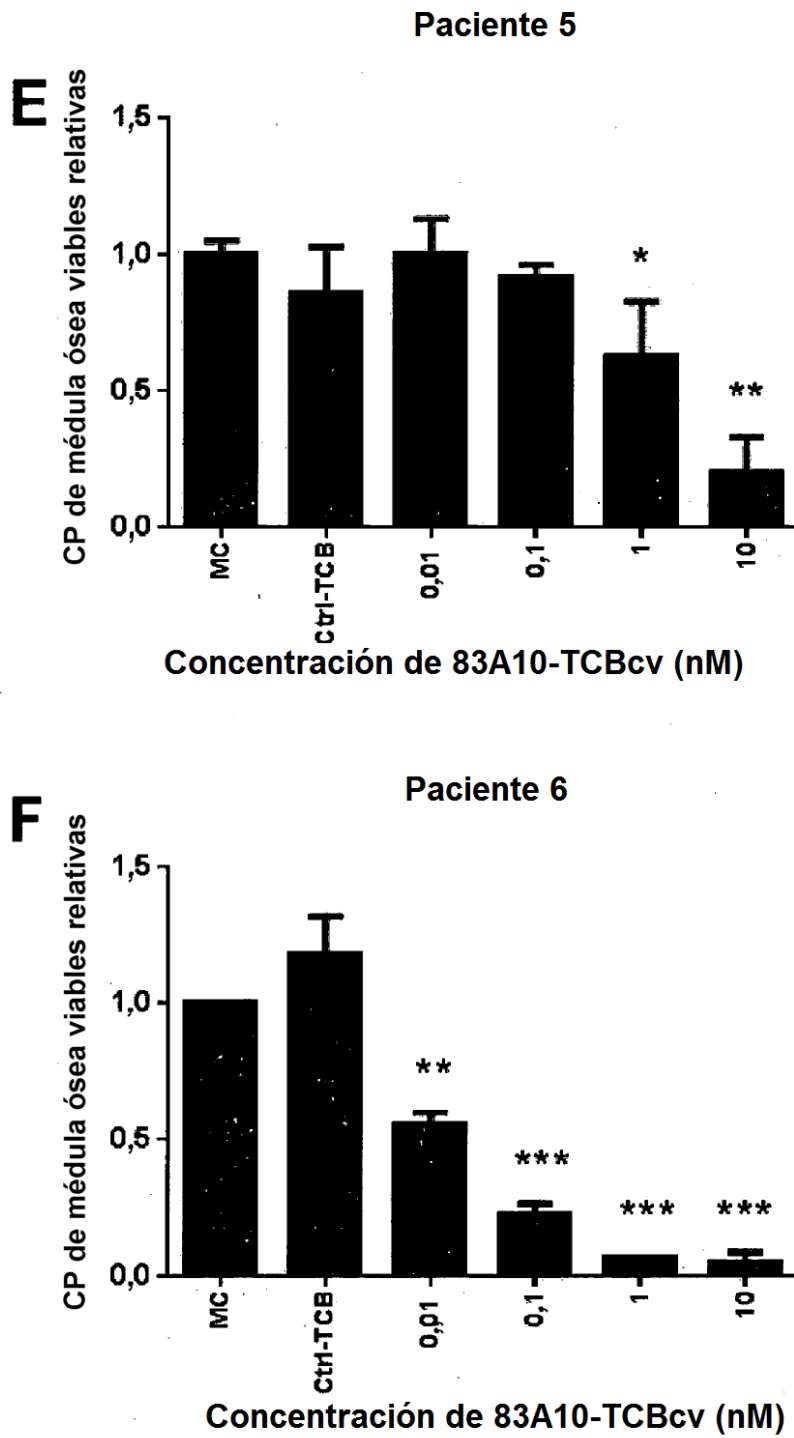


Fig. 23

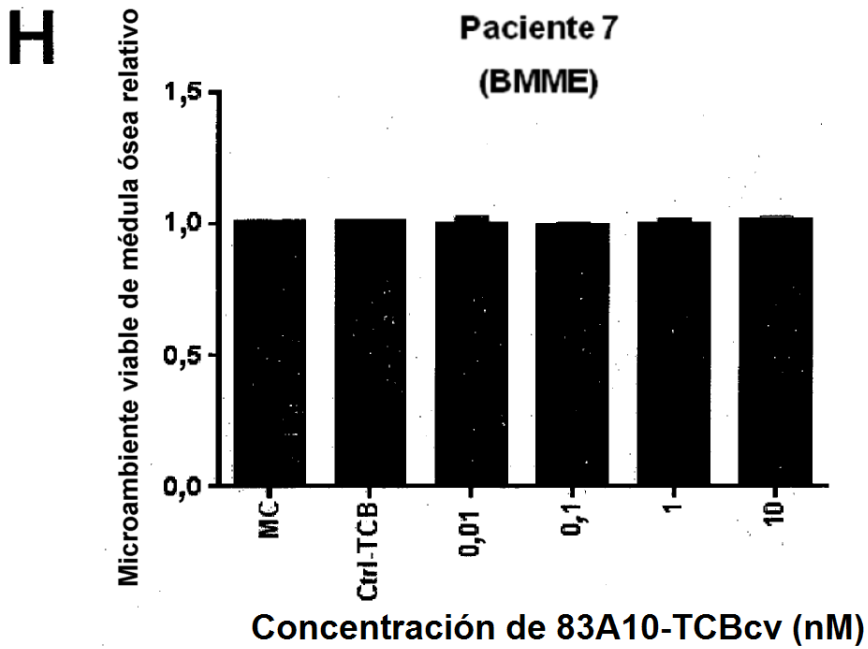
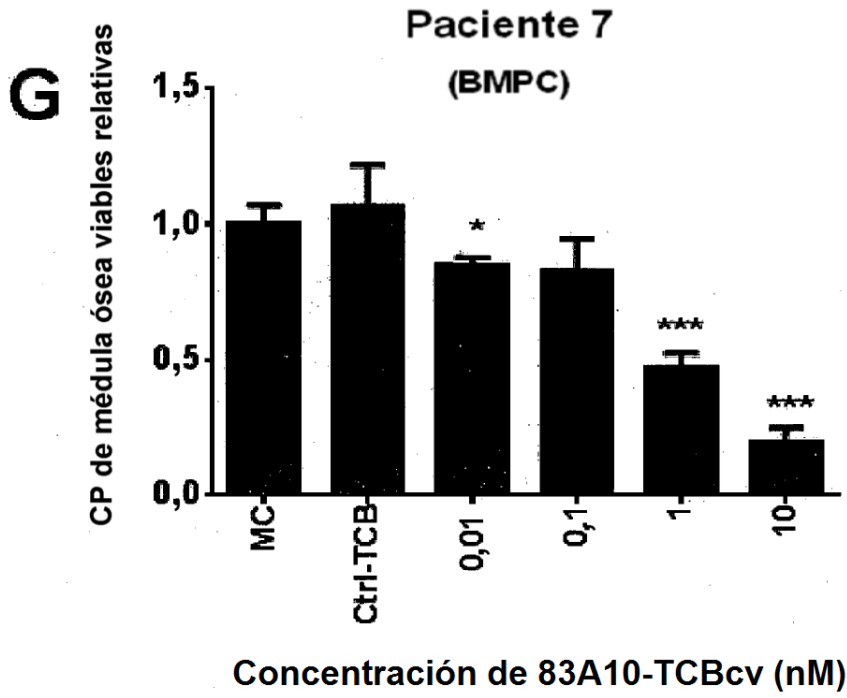


Fig. 24

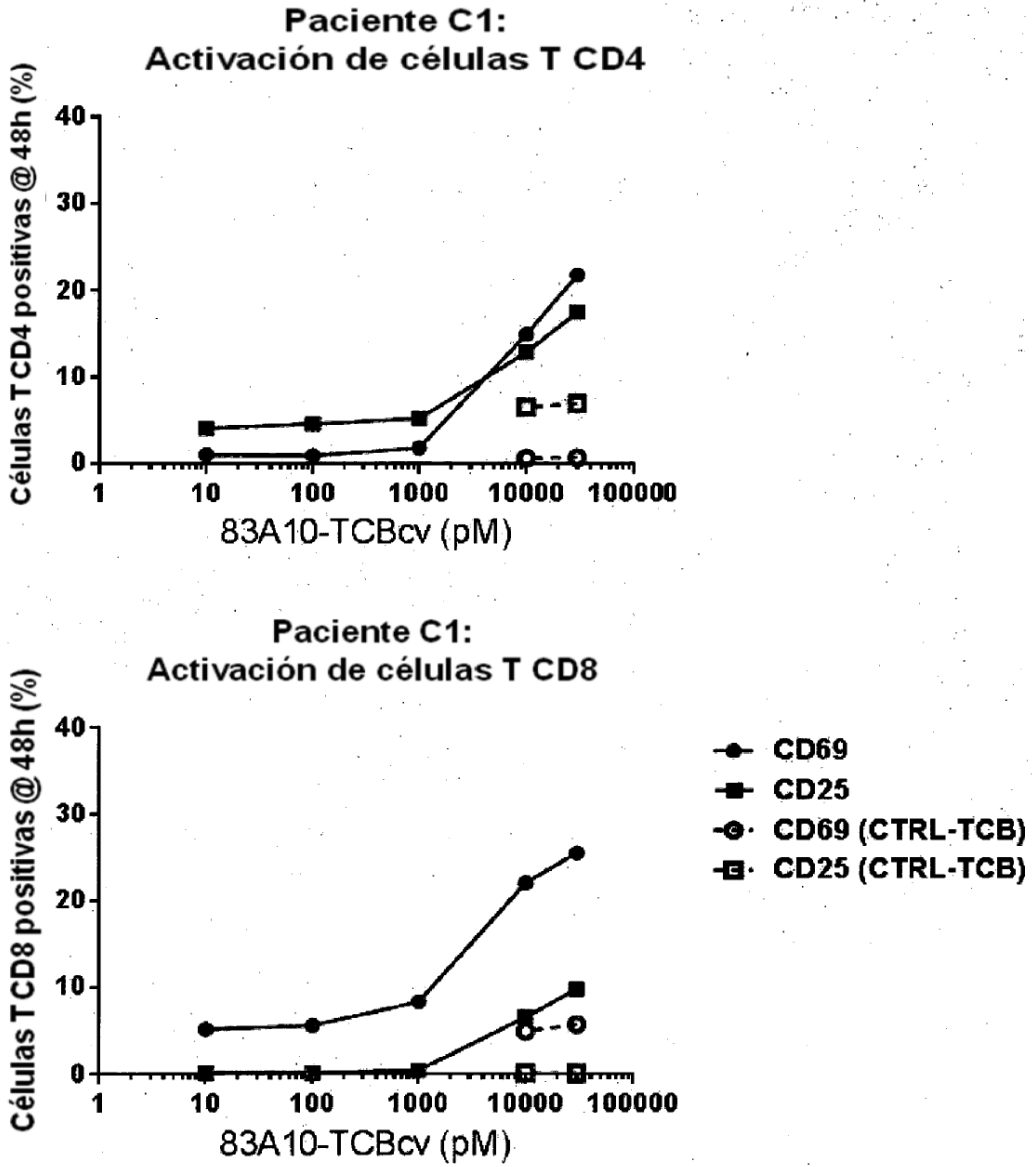


Fig. 25

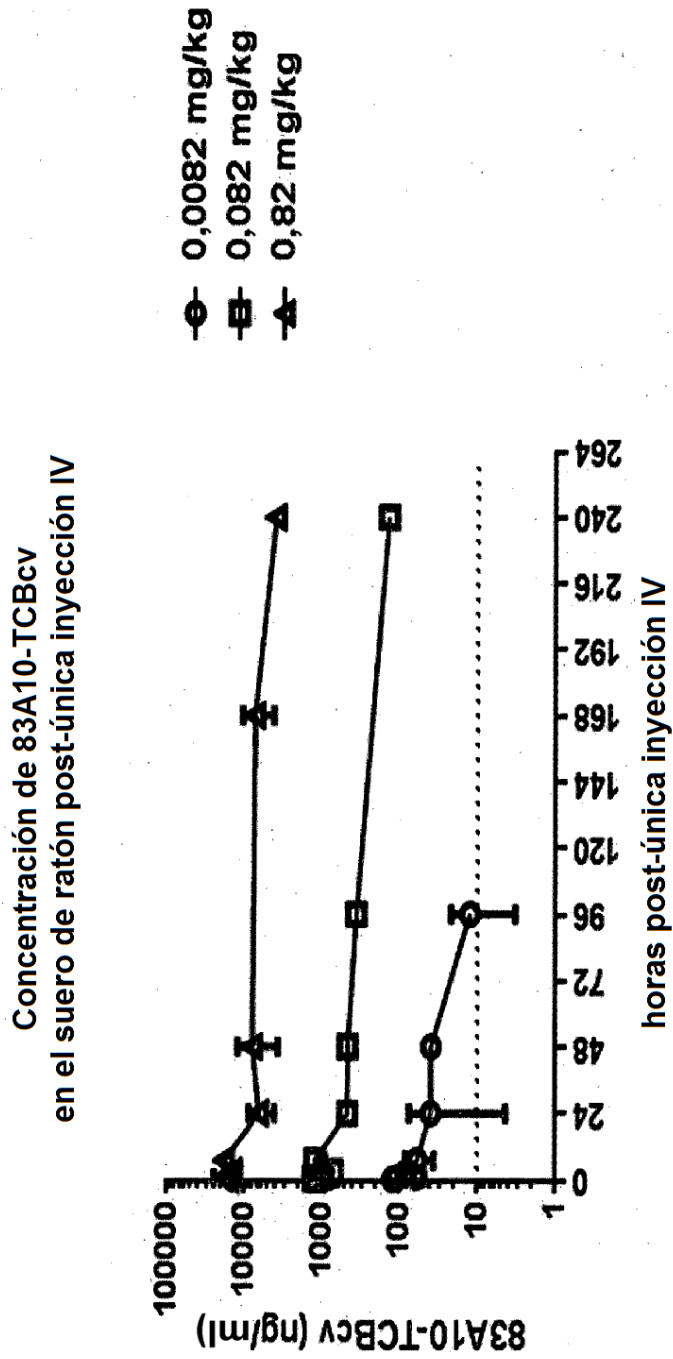


Fig. 26

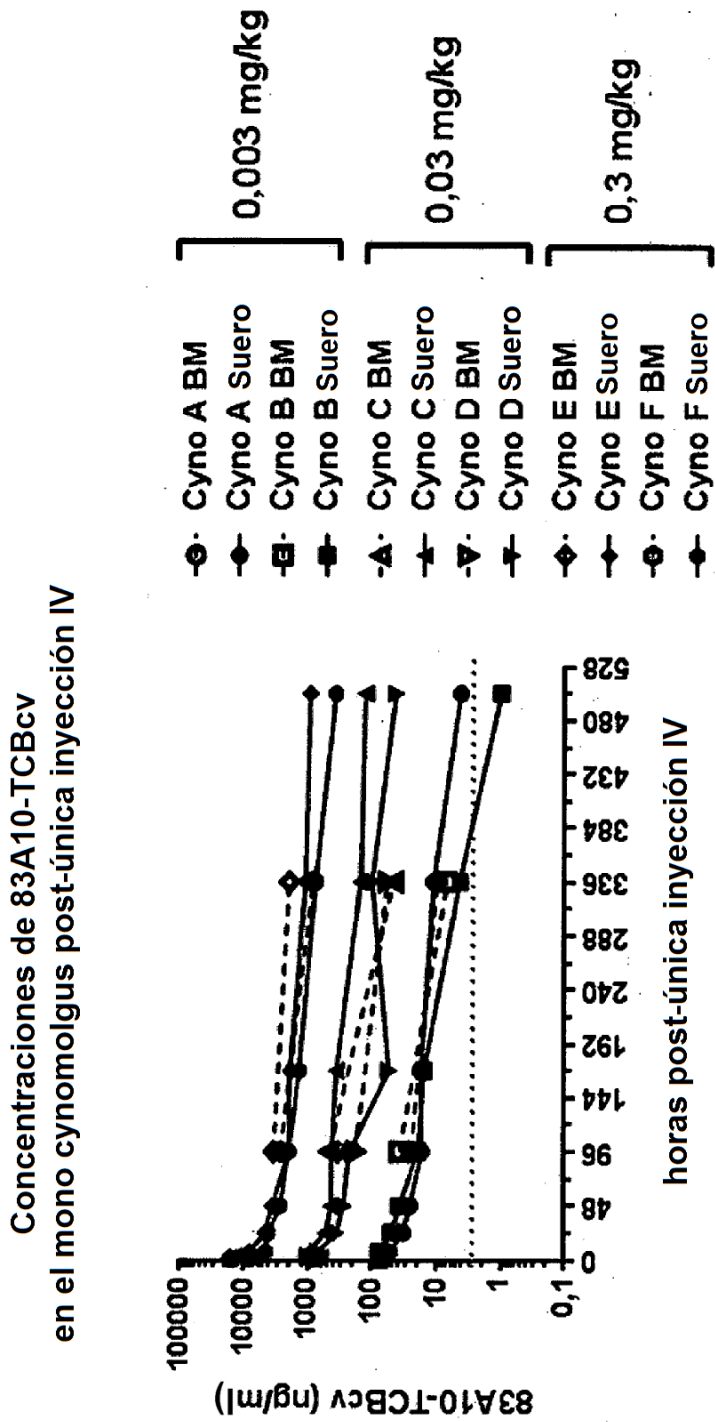


Fig. 27

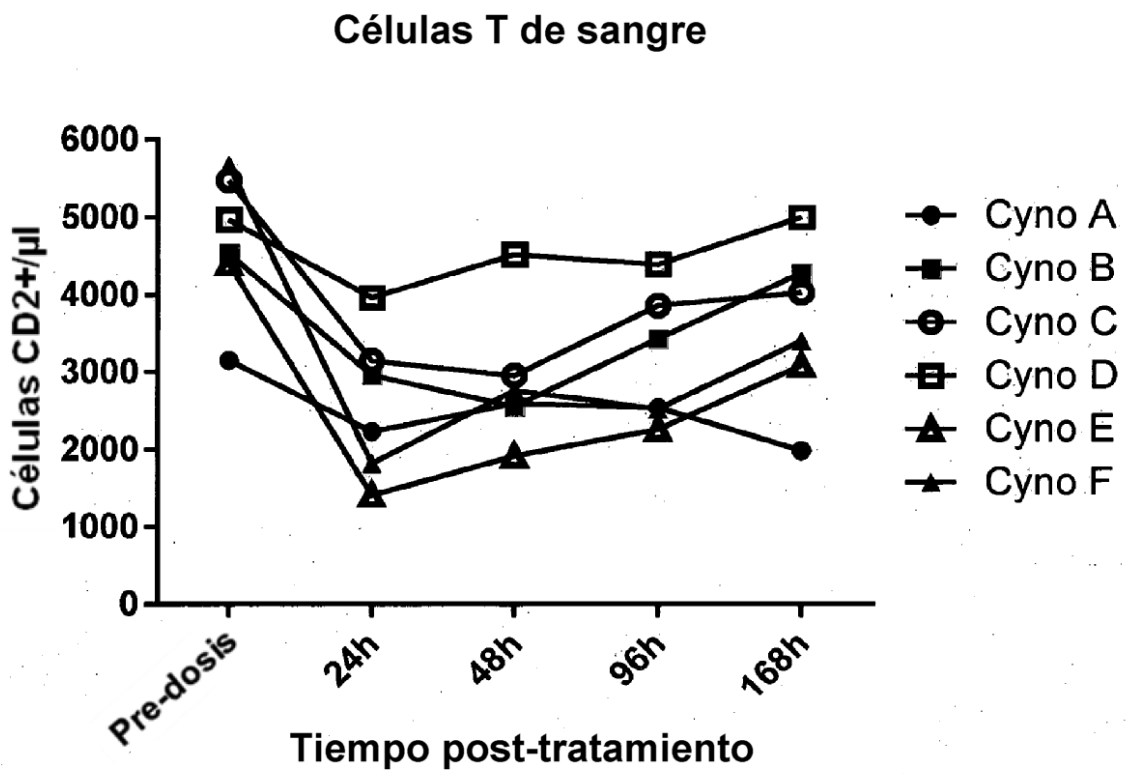




Fig. 28A

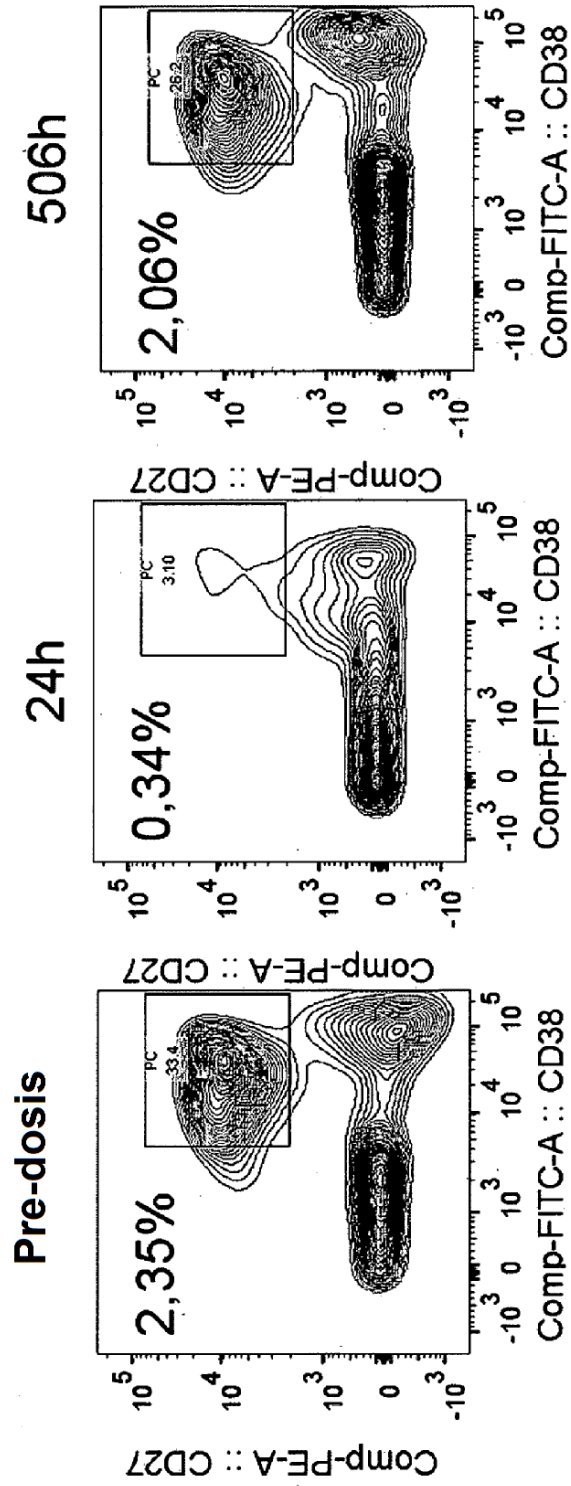


Fig. 28B

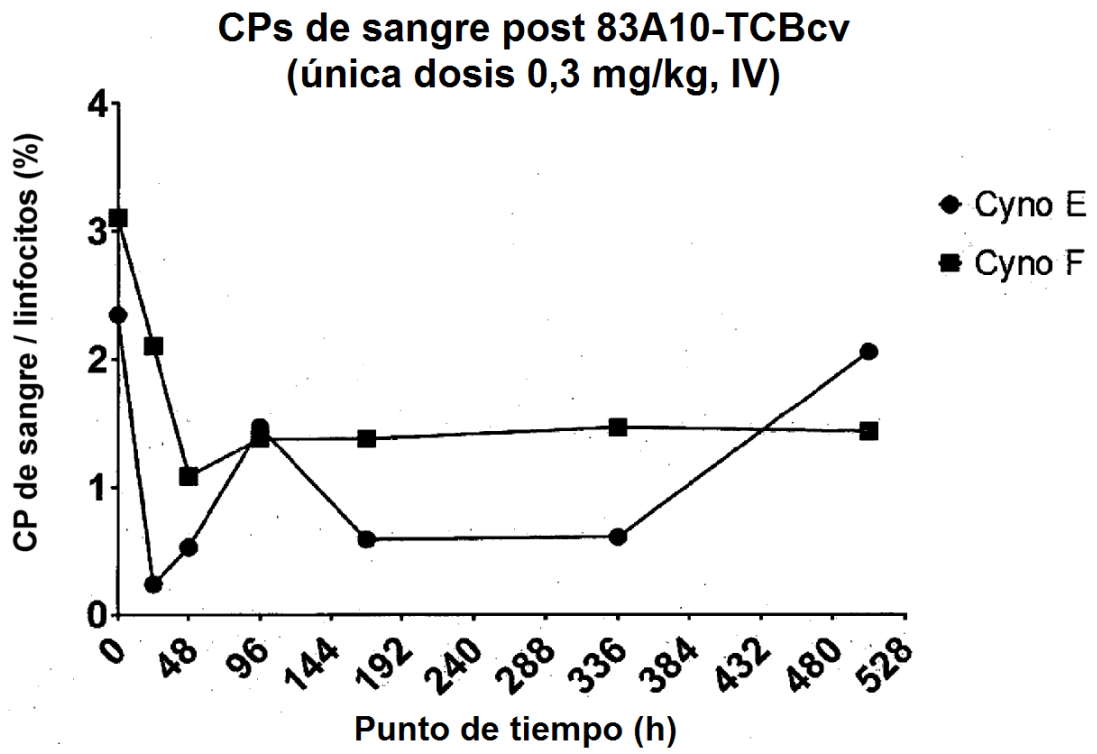


Fig. 29

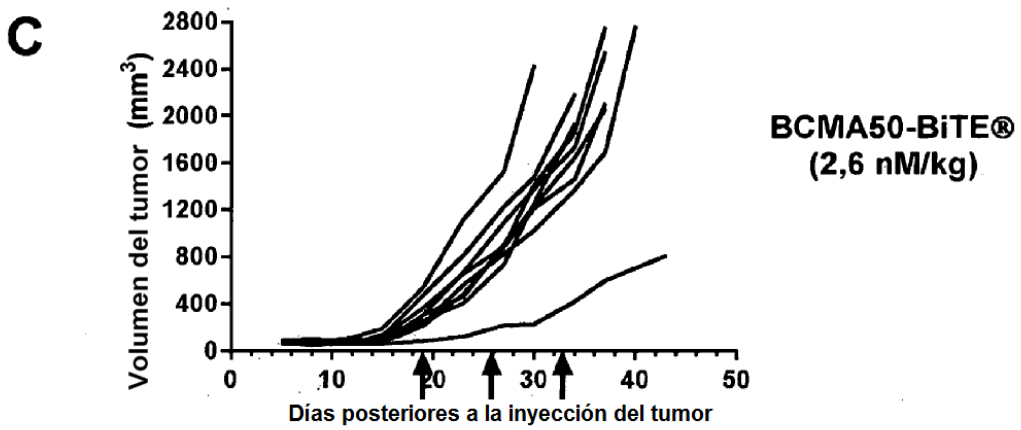
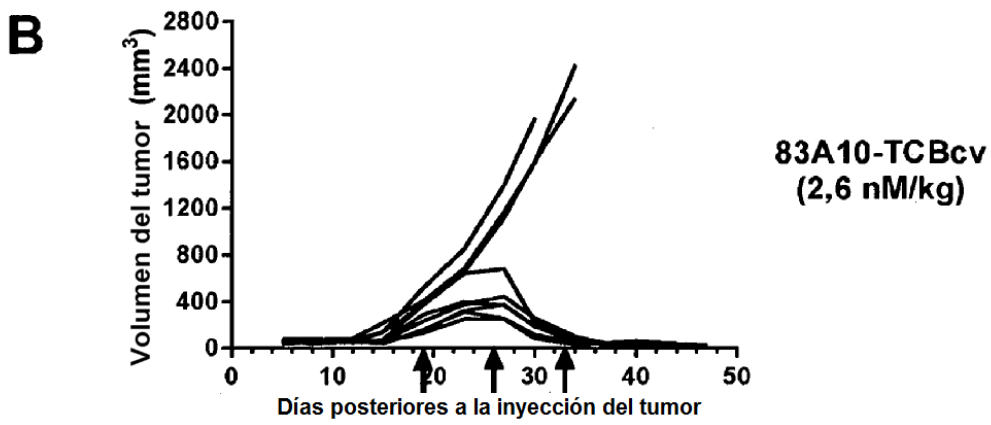
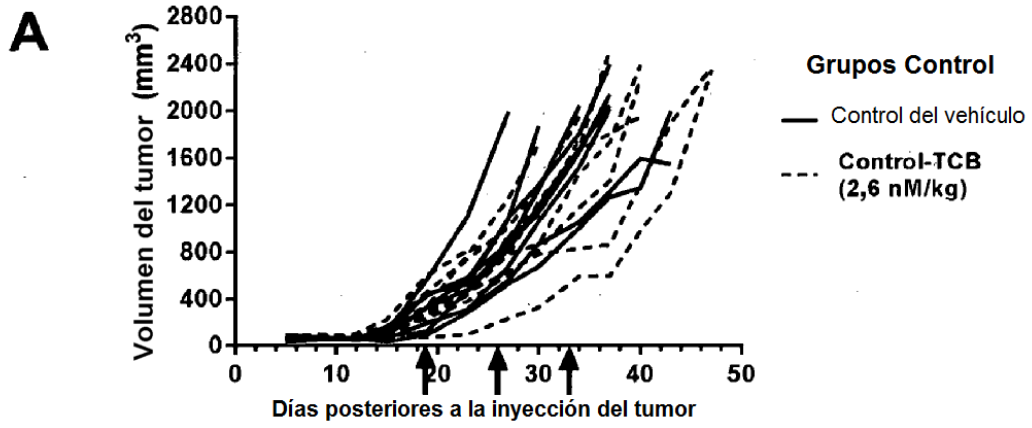


Fig. 30

