

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 573**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2016 PCT/US2016/017141**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16130539**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2016 E 16749705 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3256164**

54 Título: **Anticuerpos multiespecíficos con afinidad por el antígeno A33 humano y el complejo metálico de DOTA**

30 Prioridad:

09.02.2015 US 201562113988 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2020

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (50.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US y
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHEAL, SARAH M.;
XU, HONG;
LARSON, STEVEN M.;
CHEUNG, NAI-KONG;
WITTRUP, KARL DANE y
TZENG, ALICE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 789 573 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 multiespecíficos con afinidad por el antígeno A33 humano y el complejo metálico de DOTA

Antecedentes

5 Los agentes terapéuticos basados en anticuerpos ofrecen una promesa significativa, particularmente en el tratamiento de cáncer. Están desarrollándose una variedad de formatos, incluyendo monoclonales, murinos, quiméricos, humanizados, humanos, de longitud completa, Fab, pegilados, radiomarcados, conjugados con fármacos, multiespecíficos, etc. De los más de 30 agentes de anticuerpos terapéuticos que han recibido la aprobación para la comercialización en los Estados Unidos o Europa (véase, por ejemplo, Reichert, mAbs 4:3, 413, mayo/junio de 2012), se han aprobado dos anticuerpos biespecíficos (catumaxomab y blinatumomab) producidos
10 usando diferentes tecnologías para su uso en seres humanos. El desarrollo de agentes de anticuerpos eficaces particulares todavía sigue siendo un desafío.

El documento WO2010099536 describe composiciones y métodos para el tratamiento de cáncer y enfermedad infecciosa. Las composiciones incluyen proteínas modificadas por ingeniería que se unen específicamente a un quelato metálico y pueden ser biespecíficas.

15 Davis-Orcutt *et al.* (PROT. ENGIN., DESIGN & SELECTION, (2010), vol. 23, n.º 4, páginas 221 - 228, XP002781611 [I] 1-14) describe una topología de anticuerpo biespecífico de IgG-scFV modular.

El documento WO2014144763 describe agentes de anticuerpos anti-GD2, y diversos métodos y reactivos relacionados con los mismos incluyendo, por ejemplo, para la detección, prevención y/o el tratamiento terapéutico de enfermedades relacionadas con GD2, en particular, neuroblastoma.

20 Cheal *et al.* (Mol Cancer Ther. 2014 (13) (7) 1803-1812; DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0933) describe la selección como diana en múltiples etapas del disialogangliósido GD2 usando un anticuerpo biespecífico de IgG-scFv con afinidad por GD2 y el complejo metálico de DOTA.

25 Heath *et al.* (PNAS, 21 de enero de 1997, 94 (2) 469-474; <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.469>) describe que el antígeno A33 humano es una glicoproteína transmembrana y es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

El documento WO9822149 describe el uso terapéutico de fragmentos, anticuerpos humanizados, etc., que se unen al antígeno A33. Las moléculas de anticuerpo se describen como útiles en el tratamiento de diversas neoplasias, incluyendo cáncer de colon.

30 King *et al.* (Br. J. Cancer 1995, 72 1364-1372) da a conocer el resto de inmunoglobulina hA33 ligado a itrio para su uso en radioinmunoterapia. El itrio se liga al anticuerpo por medio de un ligador de maleimida CT77.

Cheal *et al.* (J. NUCL. MED., (201711), vol. 58, n.º 11, páginas 1735 - 1742, XP002781616 [T] 1-14) describe radioinmunoterapia curativa en múltiples ciclos monitorizada mediante agentes teranósticos basados en SPECT/CT cuantitativa, y que usa una estrategia de selección como diana previa de anticuerpos biespecíficos en cáncer colorrectal.

35 Sumario de invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1 en el presente documento.

40 Tal como se apreciará, el anticuerpo biespecífico de la invención se une, por un lado, a glicoproteína A33 que está presente en varios cánceres y, por otro lado, al quelante DOTA-Bn, que puede complejarse a su vez con radioisótopos como ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y y ⁸⁶Y. Por tanto, el anticuerpo biespecífico de la invención es adecuado para su uso en la terapia contra el cáncer.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de aspectos útiles de la divulgación.

45 Se describen, entre otras cosas, agentes de unión multiespecíficos que incluyen restos de unión que interaccionan con una diana particular. En muchas descripciones, tales restos de unión son o comprenden componentes de anticuerpo. En algunas descripciones, los agentes de unión multiespecíficos comprenden elementos de unión del anticuerpo humanizado A33 (denominado en el presente documento huA33). En algunas descripciones, los agentes de unión multiespecíficos comprenden un primer resto de unión basado en huA33 y un segundo resto de unión que interacciona con un compuesto orgánico o inorgánico. Tales agentes proporcionados tienen características
50 funcionales mejoradas en comparación con agentes de unión parentales que carecen de tales componentes descritos en el presente documento.

- En particular, se describen agentes de anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) mejorados que se unen a la glicoproteína A33 y ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA-Bn), en los que dichos agentes de unión multiespecíficos contienen una o más características estructurales (por ejemplo, una o más CDR) del anticuerpo humanizado A33 y una o más características estructurales (por ejemplo, una o más CDR) del anticuerpo monoclonal 2D12.5. En algunas descripciones, los agentes de unión multiespecíficos proporcionados demuestran alta captación tumoral y baja toxicidad para tejidos normales (por ejemplo, médula ósea y riñón) en comparación con los anticuerpos parentales A33 y 2D12.5. En algunas descripciones, los agentes de unión multiespecíficos proporcionados superan las deficiencias de dosis tumoral subóptima y de índice terapéutico cuando se emplean en un enfoque de radioinmunoterapia dirigida previamente para mejorar tumores positivos para A33.
- 5 Se describe un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno basado en anticuerpo A33 humanizado (huA33) y un segundo sitio de unión a antígeno basado en anticuerpo monoclonal 2D12.5. En algunas descripciones, el anticuerpo 2D12.5 está humanizado.
- En algunas descripciones, los primeros sitios de unión a antígeno y/o los segundos sitios de unión a antígeno son o comprenden una cadena o cadenas polipeptídicas.
- 15 En algunas descripciones, una cadena o cadenas polipeptídicas incluyen las CDR de cadena pesada encontradas en una secuencia que aparece en la tabla 8. En algunas descripciones determinadas, las CDR de cadena pesada se encuentran en anticuerpo A33 humanizado (huA33). En algunas descripciones, una cadena o cadenas polipeptídicas incluyen las CDR de cadena ligera encontradas en una secuencia que aparece en la tabla 8. En algunas descripciones determinadas, las CDR de cadena ligera se encuentran en anticuerpo A33 humanizado (huA33).
- 20 En algunas descripciones, una cadena o cadenas polipeptídicas incluyen las CDR de cadena pesada y ligera encontradas en una o más secuencias que aparecen en la tabla 8. En algunas descripciones determinadas, las CDR de cadena pesada y ligera se encuentran en anticuerpo A33 humanizado (huA33).
- En algunas descripciones, los primeros y/o segundos sitios de unión a antígeno son o comprenden fragmentos variables de cadena sencilla (scFv). En algunas descripciones, un primer sitio de unión a antígeno se compone de una molécula de inmunoglobulina y el segundo sitio de unión a antígeno se compone de un scFv, scFab, Fab o Fv. En algunas descripciones, un segundo sitio de unión a antígeno es un scFv. En algunas descripciones determinadas, un segundo sitio de unión a antígeno es scFv C825. En algunas descripciones, el scFv C825 está humanizado. En algunas descripciones, un scFv se liga al extremo C-terminal de la cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina. En algunas descripciones, un scFv se liga al extremo C-terminal de la cadena ligera de la molécula de inmunoglobulina.
- 25 También se describe un anticuerpo biespecífico compuesto de una molécula de inmunoglobulina basado en anticuerpo A33 humanizado (huA33), y un scFv que se une a ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA-Bn), en el que el scFv se basa en C825 y se liga al extremo C-terminal de la cadena ligera de huA33 y el anticuerpo biespecífico se caracteriza por un impacto inmunológico limitado cuando se administra a un organismo.
- 30 En algunas descripciones, una molécula de inmunoglobulina es una IgG. En algunas descripciones, una molécula de inmunoglobulina es una IgG aglicosilada. En algunas descripciones, una molécula de inmunoglobulina es una IgG que tiene una sustitución K322A. En algunas descripciones, una molécula de inmunoglobulina es una IgG aglicosilada que tiene una sustitución K322.
- 40 En diversas descripciones, un anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En diversas descripciones, un anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7. En diversas descripciones, un anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 y comprende además SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.
- 45 En diversas descripciones, un anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 7.
- También se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia codificante para parte o toda de una cadena polipeptídica de un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento. En algunas descripciones determinadas, la secuencia codificante está optimizada por codón.
- 50 También se describe un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento.
- También se describe una célula huésped que comprende una célula huésped tal como se describe en el presente documento.
- 55 También se describe un método de producción de un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento, comprendiendo el método las etapas de cultivar una célula huésped tal como se describe en el presente documento en un medio de cultivo en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo biespecífico, y separar el

anticuerpo biespecífico del medio de cultivo.

También se describe una composición que comprende un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento.

5 También se describe una composición farmacéutica que comprende una composición tal como se describe en el presente documento o un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento.

También se describe el uso de una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento o una composición tal como se describe en el presente documento para el tratamiento o diagnóstico de cáncer.

10 También se describe el uso de un anticuerpo biespecífico, una composición o composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento para el tratamiento o la detección de un estado relacionado con la expresión de A33.

También se describe un kit que comprende un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento.

También se describe un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para su uso en medicina.

15 También se describe el uso de un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para su uso en una prueba o un ensayo de diagnóstico.

También se describe el uso de un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el diagnóstico de cáncer.

También se describe el uso de un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

20 También se describe el uso de un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer gástrico o cáncer pancreático.

25 También se describe un método de tratamiento de un estado médico en un sujeto, en el que el estado médico se caracteriza por la expresión de A33, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento a dicho sujeto. En algunas descripciones, un estado médico incluye un tumor positivo para A33. En algunas descripciones determinadas, un estado médico es cáncer colorrectal, cáncer gástrico o cáncer pancreático.

30 También se describe un método de destrucción de células tumorales, comprendiendo el método etapas de poner en contacto células tumorales con un anticuerpo biespecífico, anticuerpo biespecífico que se compone de un primer sitio de unión a antígeno basado en anticuerpo A33 humanizado (huA33) y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA-Bn), realizándose la puesta en contacto en condiciones y durante un tiempo suficientes de modo que se observe la destrucción de las células tumorales.

35 También se describe un método de inhibición del crecimiento tumoral, comprendiendo el método las etapas de poner en contacto células tumorales con un anticuerpo biespecífico, anticuerpo biespecífico que se compone de un primer sitio de unión a antígeno basado en anticuerpo A33 humanizado y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), realizándose la puesta en contacto en condiciones y durante un tiempo suficientes para que el anticuerpo biespecífico de no unión depure la sangre, para permitir que la última etapa de DOTA-Bn conjugado con una toxina destruya células tumorales.

40 En algunas descripciones, una etapa de puesta en contacto comprende administrar un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento a un organismo, y la administración se realiza de modo que el anticuerpo biespecífico no unido se somete a aclaramiento de la sangre. En algunas descripciones, una etapa de administración comprende administrar un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento en combinación con un conjugado que comprende DOTA-Bn conjugado con una carga útil, realizándose la administración de modo que la carga útil se administre a células tumorales. En algunas descripciones, la administración se realiza de modo que las células tumorales se saturan sustancialmente con un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento. En algunas descripciones, la administración se realiza de modo que células tumorales se saturan sustancialmente por un anticuerpo biespecífico tal como se describe en el presente documento antes de la administración de un conjugado. En algunas descripciones, la administración se realiza según un régimen de combinación caracterizado por un índice terapéutico para el conjugado que es al menos
45
50 10 veces mejor que el observado para un régimen de referencia en el que el conjugado se administra como una monoterapia de una única etapa.

En algunas descripciones, la administración es mediante un régimen que incluye uno o más ciclos. En algunas descripciones, la administración es mediante un régimen que incluye, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ciclos.

En algunas descripciones, la administración es mediante un régimen que incluye uno o más ciclos de una primera etapa de administración en la que se administra un anticuerpo biespecífico, una segunda etapa de administración en la que se administra un conjugado, y al menos una tercera etapa de administración en la que se administra el mismo conjugado o un conjugado diferente DOTA-Bn conjugado con una carga útil. En algunas descripciones, una primera etapa de administración se realiza de modo que las células tumorales se saturan sustancialmente con un anticuerpo biespecífico. En algunas descripciones, una primera etapa de administración se realiza antes de una segunda etapa de administración y de cualquier tercera etapa de administración, y no se realiza administración adicional de un anticuerpo biespecífico dentro del ciclo. En algunas descripciones determinadas, ningún ciclo después de un primer ciclo incluye ninguna administración de un anticuerpo biespecífico. En algunas descripciones, la administración se realiza a lo largo de un periodo de horas a días.

En algunas descripciones, un conjugado se administra a lo largo de minutos.

En algunas descripciones, un segundo sitio de unión a antígeno se basa en anticuerpo monoclonal 2D12.5. En algunas descripciones, el segundo sitio de unión a antígeno se basa en 2D12.5 humanizado.

También se describe un método de tratamiento o diagnóstico de un cáncer positivo para A33 en un sujeto, comprendiendo el método administrar un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento a un sujeto, realizándose la administración en condiciones y durante un tiempo suficientes para que el anticuerpo biespecífico se ubique en uno o más tumores que expresan el antígeno A33, seguido de administrar un agente de aclaramiento al sujeto, en el que el agente de aclaramiento retira anticuerpo biespecífico no unido, seguido de administrar DOTA-Bn radiomarcado al sujeto. En algunas descripciones determinadas, el método comprende además administrar el anticuerpo biespecífico una segunda vez al sujeto.

En algunas descripciones, la administración del anticuerpo biespecífico una segunda vez al sujeto se realiza después de administrar un agente de aclaramiento. En algunas descripciones, administrar el anticuerpo biespecífico una segunda vez al sujeto se sigue de administrar un agente de aclaramiento una segunda vez al sujeto.

En algunas descripciones, un método de tratamiento tal como se describe en el presente documento da como resultado sustancialmente ninguna toxicidad por radiación a tejidos normales. En algunas descripciones, un método de tratamiento tal como se describe en el presente documento da como resultado un aumento de más de 10 veces en el índice terapéutico. En algunas descripciones, un método de tratamiento tal como se describe en el presente documento es curativo.

En muchas descripciones, un agente de aclaramiento es un agente de aclaramiento a base de dextrano. En muchas descripciones, un DOTA radiomarcado es ^{177}Lu -DOTA-Bn, ^{90}Y -DOTA-Bn o ^{86}Y -DOTA-Bn.

En algunas descripciones, una carga útil es una carga útil tóxica. En algunas descripciones, una carga útil es un modificador de la respuesta biológica. En algunas descripciones, una carga útil se selecciona del grupo que consiste en restos detectables y restos activos. En algunas descripciones, una carga útil es o comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en radioisótopos, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, nanopartículas, virus, y combinaciones de los mismos.

Breve descripción del dibujo

El dibujo incluido en el presente documento, que se compone de las siguientes figuras, es con fines de ilustración únicamente y no de limitación.

La figura 1 muestra la evaluación *in vitro* de la pureza bioquímica de huA33-C825 mediante cromatograma de SE-HPLC (UV 280 nm). El pico principal a 7,853 minutos es el anticuerpo biespecífico completamente apareado con un peso molecular aproximado de 210 KDa.

La figura 2 muestra sensogramas Biacore a modo de ejemplo de la unión de anticuerpo a (A) antígeno A33 humano y (B) BSA-(Y)-DOTA-Bn.

La figura 3 muestra (A) actividad a modo de ejemplo de lutecio-177 para tumores y diversos tejidos normales entre diferentes dosis de agente de aclaramiento (CA) y control (solución salina), (B) actividad a modo de ejemplo de lutecio-177 a diversas concentraciones de CA, (C) razones de tumor con respecto a órgano a modo de ejemplo a diversas concentraciones de CA, y (D) actividad a modo de ejemplo de lutecio-177 a horas tras la inyección. La actividad se expresa como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g). Hay una retención prolongada en el tumor a lo largo de múltiples horas y un rápido aclaramiento de otros tejidos.

La figura 4 muestra la captación tumoral a modo de ejemplo de ^{177}Lu -DOTA-Bn a las 24 horas tras la inyección en función de la radiactividad en el tratamiento de ratones que portan un xenoinjerto de cáncer de colon humano (SW1222); (A) captación de cantidades de ^{177}Lu -DOTA-Bn en diversos tejidos. (B) Captación de cantidades de ^{177}Lu -DOTA-Bn en tumores SW1222; (C) actividad de ^{177}Lu -DOTA-Bn en riñones y tumores SW1222 24 horas tras la inyección por cantidad de ^{177}Lu -DOTA-Bn inyectado; (D) pmoles de ^{177}Lu -DOTA-Bn que se unen en el tumor 24 horas tras la inyección por cantidad de ^{177}Lu -DOTA-Bn inyectado. Se logró la saturación después de

aproximadamente 40 MBq de actividad inyectada.

La figura 5 muestra mediciones de crecimiento tumoral a modo de ejemplo (mm³) en grupos de ratones que recibieron PRIT de un único ciclo; (A) control (sin tratamiento, n=8), (B) 0,9 mCi (33,3 MBq; 1 mCi = 37 MBq) de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn solo (n = 6); (C) huA33-C825 + 0,3 mCi de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (n = 8), (D) huA33-C825 + 0,9 mCi de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (n = 8). Los tumores SW1222 de control y tratados (huA33-C825) demuestran que el patrón de crecimiento de tumores SW1222 sólo se ve mínimamente afectado por la radiactividad con una sola dosis, incluso con aumento gradual de dosis. La dosis más alta (0,9 mCi) demuestra algún efecto. La flecha indica el día en que se administró ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn. La dosis de huA33-C825 se proporcionó a t = -24 horas, seguido de un agente de aclaramiento de dextrano a t = -4 horas, y ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn a t = 0 horas.

La figura 6 muestra mediciones de crecimiento tumoral a modo de ejemplo (mm³) en ratones que recibieron PRIT de ciclo dual; (A) 2 x PRIT con huA33-C825 + 11,1 MBq (total: 22,2 MBq), (B) 2 x PRIT con huA33-C825 + 33,3 MBq (total: 66,6 MBq), (C) 2 x PRIT con huA33-C825 + 55,5 MBq (total: 111 MBq), (D) 1x PRIT con huA33-C825 + 111 MBq (total: 111 MBq). Para la PRIT de ciclo dual administrada a los 10 y 17 días tras la inoculación del tumor, hay una respuesta marcada en todos los niveles de dosis con respuestas completas observadas de manera dependiente de la dosis. En la figura 6C (2 x PRIT con huA33-C825 + 55,5 MBq (total: 111 MBq)), todos los tumores han respondido al tratamiento. Se determinó la toxicidad monitorizando el peso y el aspecto global al menos tres veces por semana, así como la evaluación histopatológica del hígado, riñón, bazo y la médula ósea por el laboratorio de patología comparativa del MSKCC. No hubo toxicidad detectable en los ratones.

La figura 7 muestra una curva de respuesta tumoral a modo de ejemplo que resume los resultados de un estudio de terapia en múltiples ciclos con DOTA-PRIT con ratones desnudos que portan tumores de cáncer de colon SW1222. Se representan tres ramas de tratamiento: sin tratamiento (triángulos), ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn solo (cuadrados) y un tratamiento con DOTA-PRIT de 3 ciclos de con 55 MBq de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn/ciclo (165 MBq de actividad administrada en total; círculos y cada tratamiento indicados mediante flechas debajo del eje x).

La figura 8 muestra imágenes de nanoSPECT/CT de la intensidad máxima a modo de ejemplo y concentración de la actividad en el tumor a lo largo del tiempo. Se recogieron imágenes de un ratón desnudo que porta el tumor SW1222 tratado con un único ciclo de PRIT con anticuerpo anti-GPA33 + 55 MBq de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn y se obtuvieron imágenes mediante nanoSPECT/CT a 1, 24 y 160 horas tras la inyección de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn. Se muestra imágenes de nanoSPECT/CT de la intensidad máxima de la región del flanco inferior en la que se ubica el tumor. La concentración de la actividad en el tumor se determinó mediante análisis de la región de interés de las imágenes calibradas.

Definiciones

El alcance de presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas a la misma y no se limita por realizaciones particulares descritas en el presente documento; los expertos en la técnica, al leer la presente divulgación, serán conscientes de las diversas modificaciones que pueden ser equivalentes a tales realizaciones descritas, u de otro modo dentro del alcance de las reivindicaciones.

En general, la terminología usada en el presente documento es según su significado entendido en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario. A continuación se proporcionan definiciones explícitas de determinados términos; los significados de estos y otros términos en casos particulares en toda esta memoria descriptiva serán evidentes para los expertos en la técnica a partir del contexto.

Con el fin de que la presente invención se entienda más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos a continuación. Definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen en toda la memoria descriptiva.

“Afinidad”: tal como se conoce en la técnica, “afinidad” es una medida de la firmeza con la que un ligando particular se une a su pareja. Las afinidades pueden medirse de diferentes modos. En algunas descripciones, la afinidad se mide mediante un ensayo cuantitativo. En algunas de tales descripciones, la concentración de la pareja de unión puede fijarse para estar en exceso de concentración de ligando para imitar las condiciones fisiológicas. Alternativa o adicionalmente, en algunas descripciones, la concentración de la pareja de unión y/o la concentración del ligando pueden variarse. En algunas de tales descripciones, la afinidad puede compararse con una referencia en condiciones comparables (por ejemplo, concentraciones).

“Afinidad madurada” (o “anticuerpo de afinidad madurada”), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no presenta aquella(s) alteración/alteraciones. En algunas descripciones, los anticuerpos de afinidad madurada tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para un antígeno diana. Pueden producirse anticuerpos de afinidad madurada mediante cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.*, 1992, *BioTechnology* 10:779-783 describe maduración de afinidad mediante intercambio de dominios V_H y V_L. Se describe la mutagénesis al azar de CDR y/o residuos de región de marco por: Barbas *et al.*, 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 91:3809-3813; Schier *et al.*, 1995, *Gene* 169: 147-155; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, *J.*

Immunol. 154(7):3310-9; y Hawkins *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 226:889-896.

“Mejoría”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la prevención, reducción o paliación de un estado, o a la mejora del estado de un sujeto. La mejoría incluye, pero no requiere una recuperación completa o prevención completa de una enfermedad, un trastorno o estado (por ejemplo, lesión por radiación).

5 “Animal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas descripciones, “animal” se refiere a seres humanos, de cualquier sexo y en cualquier etapa de desarrollo. En algunas descripciones, “animal” se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En determinadas descripciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado bovino, un primate y/o un cerdo). En algunas descripciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En determinadas descripciones, el animal es sensible a infección por DV. En algunas descripciones, un animal puede ser un animal transgénico, animal modificado por ingeniería genética y/o un clon.

15 “Anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, tiene su significado entendido en la técnica y se refiere a una inmunoglobulina (Ig) que se une específicamente a un antígeno particular. Tal como conocen los expertos habituales en la técnica, los anticuerpos producidos en la naturaleza se componen normalmente de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Cada cadena pesada y ligera se compone de una región variable (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H y LCVR o V_L, respectivamente) y una región constante. La región constante de una cadena pesada comprende un dominio C_H1, C_H2 y C_H3 (y opcionalmente un dominio C_H4 en el caso de IgM e IgE). La región constante de una cadena ligera se compone de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L contienen además regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, que se denominan regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el externo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Agente de anticuerpo: tal como se usa en el presente documento, el término “agente de anticuerpo” se refiere a un agente que se une específicamente a un antígeno particular. En algunas descripciones, el término abarca cualquier polipéptido con elementos estructurales de inmunoglobulina suficientes para conferir unión específica. En diversas descripciones, los agentes de anticuerpo adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, anticuerpos de un solo dominio de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos del mismo)), anticuerpos conjugados (es decir, anticuerpos conjugados o fusionados con otras proteínas, radiomarcadores, citotoxinas), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (“SMIPTM”), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos cameloides, fragmentos de anticuerpo, etc. En algunas descripciones, el término puede referirse a un péptido grapado. En algunas descripciones, el término puede referirse a un peptidomimético de unión similar a anticuerpo. En algunas descripciones, el término puede referirse a una proteína de armazón de unión similar a anticuerpo. En algunas descripciones, el término puede referirse a monocuerpos o adnectinas. En muchas descripciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye uno o más elementos estructurales reconocidos por los expertos en la técnica como una región determinante de la complementariedad (CDR); en algunas descripciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una CDR (por ejemplo, al menos una CDR de cadena pesada y/o al menos una CDR de cadena ligera) que es sustancialmente idéntica a una encontrada en un anticuerpo de referencia. En algunas descripciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que o bien es idéntica en secuencia o bien contiene entre 1-5 sustituciones de aminoácido en comparación con la CDR de referencia. En algunas descripciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que muestra una identidad de secuencia de al menos el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la CDR de referencia. En algunas descripciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que muestra una identidad de secuencia de al menos el 96%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la CDR de referencia. En algunas descripciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que se deleciona, añade o sustituye al menos un aminoácido dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es de otro modo idéntica con la de la CDR de referencia. En algunas descripciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que se delecionan, añaden o sustituyen 1-5 aminoácidos dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es de otro modo idéntica a la CDR de referencia. En algunas descripciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que se sustituye al menos un aminoácido dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es de otro modo idéntica con la de la CDR de referencia. En algunas descripciones, una CDR incluida es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia en que se delecionan, añaden o sustituyen 1-5 aminoácidos dentro de la CDR incluida en comparación con la CDR de referencia, pero la CDR incluida tiene una secuencia de aminoácidos que es de otro modo idéntica a la CDR de referencia. En algunas descripciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye elementos

estructurales reconocidos por los expertos en la técnica como un dominio variable de inmunoglobulina. En algunas descripciones, un agente de anticuerpo es una proteína de polipéptido que tiene un dominio de unión, que es homólogo o en gran parte homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. En algunas descripciones, un agente de anticuerpo es o comprende un polipéptido que incluye todas las CDR encontradas en una cadena o cadenas de anticuerpo de referencia particulares (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera).

“Componente de anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un elemento de polipéptido (que puede ser un polipéptido completo, o una porción de un polipéptido más grande, tal como, por ejemplo, un polipéptido de fusión tal como se describe en el presente documento) que se une específicamente a un epítipo o antígeno e incluye una o más características estructurales de inmunoglobulina. En general, un componente de anticuerpo es cualquier polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye elementos característicos de una región de unión a anticuerpo (por ejemplo, una cadena ligera de anticuerpo o región variable o una o más regiones determinantes de la complementariedad (“CDR”) de la misma, o una cadena pesada de anticuerpo o región variable o una o más CDR de la misma, opcionalmente en presencia de una o más regiones de marco). En algunas descripciones, un componente de anticuerpo es o comprende un anticuerpo de longitud completa. En algunas descripciones, un componente de anticuerpo es menor de la longitud completa pero incluye al menos un sitio de unión (que comprende al menos una, y preferiblemente al menos dos secuencias con estructura de anticuerpo conocido “regiones variables”). En algunas descripciones, el término “componente de anticuerpo” abarca cualquier proteína que tiene un dominio de unión, que es homólogo o en gran parte homólogo con un dominio de unión a inmunoglobulina. En descripciones particulares, un “componente de anticuerpo” incluido abarca polipéptidos que tienen un dominio de unión que muestra una identidad de al menos de 99% con un dominio de unión a inmunoglobulina. En algunas descripciones, un “componente de anticuerpo” incluido es cualquier polipéptido que tiene un dominio de unión que muestra una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 98% con un dominio de unión a inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio de unión a inmunoglobulina de referencia. Un “componente de anticuerpo” incluido puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un anticuerpo (o una porción del mismo, por ejemplo, una porción de unión a antígeno del mismo) que se encuentra en una fuente natural. Un componente de anticuerpo puede ser monoespecífico, biespecífico o multiespecífico. Un componente de anticuerpo puede incluir elementos estructurales característicos de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales anticuerpos también pueden ser formatos biespecíficos, específicos duales o multiespecíficos que se unen específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_H , V_L , C_{H1} y C_L ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_H y V_L de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_H y V_L , se codifican por genes diferenciados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se elaboren como una sola cadena de proteínas en la que las regiones V_H y V_L se aparean formando moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426; y Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). En algunas descripciones, un “componente de anticuerpo”, tal como se describe en el presente documento, es o comprende un anticuerpo de cadena sencilla de este tipo. En algunas descripciones, un “componente de anticuerpo” es o comprende un diacuerpo. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero que usan un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de ese modo a que los dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., 1994, Structure 2(12):1121-1123). En la técnica se conocen tales porciones de unión a anticuerpo (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5). En algunas descripciones, un componente de anticuerpo es o comprende un anticuerpo “lineal” de cadena sencilla que comprende un par de segmentos de Fv en tándem (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.*, 1995, Protein Eng. 8(10): 1057-1062; y la patente estadounidense n.º 5.641.870). En algunas descripciones, un componente de anticuerpo puede tener elementos estructurales característicos de anticuerpos quiméricos o humanizados. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas descripciones, un componente de anticuerpo puede tener elementos estructurales característicos de un anticuerpo humano.

“Actividad biológica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resultado o efecto biológico observable logrado por un agente o una entidad de interés. Por ejemplo, en algunas descripciones, una interacción de unión específica es una actividad biológica. En algunas descripciones, la modulación (por ejemplo, inducción, potenciamiento o inhibición) de un acontecimiento o una ruta biológica es una actividad biológica. En algunas descripciones, la presencia o el grado de una actividad biológica se evalúa a través de la detección de un producto

directo o indirecto producido por un acontecimiento o una ruta biológica de interés.

“Anticuerpo biespecífico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de unión biespecífico en el que al menos uno, y normalmente ambos, de los restos de unión es o comprende un componente de anticuerpo. Se conoce una variedad de diferentes estructuras de anticuerpo biespecífico en la técnica. En algunas descripciones, cada resto de unión en un anticuerpo biespecífico que es o comprende un componente de anticuerpo incluye regiones V_H y/o V_L ; en algunas de tales descripciones, las regiones V_H y/o V_L son aquellas encontradas en un anticuerpo monoclonal particular. En algunas descripciones, cuando el anticuerpo biespecífico contiene dos restos de unión a componente de anticuerpo, cada uno incluye regiones V_H y/o V_L de diferentes anticuerpos monoclonales. En algunas descripciones, cuando el anticuerpo biespecífico contiene dos restos de unión a componente de anticuerpo, en las que uno de los dos restos de unión a componente de anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina que tiene regiones V_H y/o V_L que contienen las CDR de un primer anticuerpo monoclonal, y uno de los dos restos de unión a componente de anticuerpo incluye un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fd, Fv, dAB, scFv, etc.) que tiene regiones V_H y/o V_L que contienen las CDR de un segundo anticuerpo monoclonal.

“Agente de unión biespecífico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de polipéptido con dos restos de unión separados, cada uno de los cuales se une con una diana distinta. En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico es o comprende un único polipéptido; en algunas descripciones, un agente de unión biespecífico es o comprende una pluralidad de péptidos que, en algunas de tales descripciones, pueden asociarse de manera covalente entre sí, por ejemplo, mediante reticulación. En algunas descripciones, los dos restos de unión de un agente de unión biespecífico reconocen sitios diferentes (por ejemplo, epítopos) de la misma diana (por ejemplo, antígeno); en algunas descripciones, reconocen dianas diferentes. En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico puede unirse simultáneamente a dos dianas que son de estructura diferente.

“Portador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una composición. En algunas descripciones a modo de ejemplo, los portadores pueden incluir líquidos estériles, tales como, por ejemplo, agua y aceites, incluyendo aceites de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. En algunas descripciones, los portadores son o incluyen uno o más componentes sólidos.

“CDR”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región determinante de la complementariedad dentro de una región variable de anticuerpo. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. Un “conjunto de CDR” se refiere a un grupo de tres o seis CDR que se producen o bien en una región variable individual que puede unirse al antígeno o bien las CDR de regiones variables de cadena pesada y ligera relacionadas que pueden unirse al antígeno. Se han establecido en la técnica determinados sistemas para definir límites de CDR (por ejemplo, Kabat, Chothia, etc.); los expertos en la técnica aprecian las diferencias entre y en estos sistemas y pueden comprender los límites de CDR en la medida necesaria para comprender y practicar la invención reivindicada.

“Anticuerpo injertado con CDR”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos comprende secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie pero en el que las secuencias de una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L se sustituyen por secuencias de CDR de otras especies, tales como anticuerpos que tienen regiones V_H y V_L murinas en las que una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) se ha sustituido por secuencias de CDR humanas. Asimismo, un “anticuerpo injertado con CDR” también puede referirse a anticuerpos que tienen regiones V_H y V_L humanas en las que una o más de las CDR humanas (por ejemplo, CDR3) se ha sustituido por secuencias de CDR de ratón.

“Anticuerpo quimérico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos incluye secuencias de región V_H y V_L que se encuentran en una primera especie y secuencias de regiones constantes que se encuentran en una segunda especie, diferente de la primera especie. En muchas descripciones, un anticuerpo quimérico tiene regiones V_H y V_L murinas ligadas a regiones constantes humanas. En algunas descripciones, un anticuerpo con regiones V_H y V_L humanas ligadas a regiones constantes no humanas (por ejemplo, una región constante de ratón) se denomina “anticuerpo quimérico inverso”.

“Terapia de combinación”: tal como se usa en el presente documento, el término “terapia de combinación” se refiere a aquellas situaciones en las que un sujeto se expone simultáneamente a dos o más regímenes terapéuticos (por ejemplo, dos o más agentes terapéuticos). En algunas descripciones, dos o más agentes o pueden administrarse simultáneamente; en algunas descripciones, tales agentes pueden administrarse secuencialmente; en algunas descripciones, tales agentes se administran en regímenes de dosificación solapantes.

“Comparable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc., que pueden no ser idénticos entre sí pero que son suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos de modo que pueden extraerse conclusiones de manera razonada basándose en diferencias o similitudes observadas. Los expertos habituales en la técnica entenderán, en contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia dada para dos o más de tales agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc., que van a considerarse comparables.

“Correspondiente a”, tal como se usa en el presente documento, designa la posición/identidad de un residuo de aminoácido en un polipéptido de interés. Aquellos de habilidad común apreciarán que, con fines de simplicidad, los residuos en un polipéptido se designan a menudo usando un sistema de numeración canónico basándose en un polipéptido relacionado de referencia, de modo que un aminoácido “correspondiente a” un residuo en la posición 190, por ejemplo, no es necesario que sea realmente el 190º aminoácido en una cadena de aminoácidos particular, sino que más bien corresponde al residuo encontrado en 190 en el polipéptido de referencia; los expertos habituales en la técnica aprecian fácilmente cómo identificar aminoácidos “correspondientes”.

“Agentes de detección”, tal como se describe en el presente documento, se refieren a restos o agentes que son susceptibles a detección, por ejemplo, debido a sus características químicas y/o estructurales específicas, y/o sus propiedades funcionales. Los ejemplos no limitativos de tales agentes incluyen enzimas, radiomarcadores, haptenos, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, moléculas de fotoafinidad, partículas coloreadas o ligandos, tales como biotina. En la técnica se conocen muchos agentes de detección, como lo son los sistemas para su unión a anticuerpos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.021.236; 4.938.948; y 4.472.509). Los ejemplos particulares pueden incluir iones paramagnéticos, isótopos radiactivos, fluorocromos, sustancias detectables por RMN, agentes de obtención de imágenes de rayos X, entre otros. En algunas descripciones, el agente de detección conjugado es un agente de diagnóstico o de obtención de imágenes.

“Forma de dosificación” y “forma de dosificación unitaria”, tal como se usa en el presente documento, el término “forma de dosificación” se refiere a una unidad físicamente discreta de un agente terapéutico para un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que va a tratarse. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada o demostrada para producir un efecto terapéutico deseado cuando se administra a una población relevante según un pauta posológica apropiado. Por ejemplo, en algunas descripciones, tal cantidad es una cantidad de dosificación unitaria (o toda una fracción de la misma) apropiada para administración según un pauta posológica que se ha determinado que se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con una pauta posológica terapéutica). Se entenderá, sin embargo, que la dosificación total administrada a cualquier paciente particular se seleccionara por un profesional médico (por ejemplo, un médico) dentro del alcance del juicio médico razonable.

“Pauta posológica” (o “régimen terapéutico”), tal como se usa en el presente documento, es un conjunto de dosis unitarias (normalmente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, normalmente separadas por periodos de tiempo. En algunas descripciones, un agente terapéutico dado tiene una pauta posológica recomendada, que puede implicar una o más dosis. En algunas descripciones, una pauta posológica comprende una pluralidad de dosis cada una de las cuales se separan entre sí por un periodo de tiempo de la misma longitud; en algunas descripciones, una pauta posológica comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan dosis individuales. En algunas descripciones, el agente terapéutico se administra de manera continua (por ejemplo, mediante infusión) a lo largo de un periodo de tiempo predeterminado. En algunas descripciones, un agente terapéutico se administra una vez al día (una dosis diaria) o dos veces en un día (dos dosis diarias). En algunas descripciones, una pauta posológica comprende una pluralidad de dosis cada una de las cuales se separan entre sí por un periodo de tiempo de la misma longitud; en algunas descripciones, una pauta posológica comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan dosis individuales. En algunas descripciones, todas las dosis dentro de una pauta posológica son de la misma cantidad de dosis unitaria. En algunas descripciones, diferentes dosis dentro de una pauta posológica son de cantidades diferentes. En algunas descripciones, una pauta posológica comprende una primera dosis en una cantidad de primera dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una cantidad de segunda dosis diferente de la cantidad de primera dosis. En algunas descripciones, una pauta posológica comprende una primera dosis en una cantidad de primera dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una cantidad de segunda dosis igual que la cantidad de primera dosis. En algunas descripciones, una pauta posológica se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra en toda una población relevante (es decir, es una pauta posológica terapéutica).

“Función efectora” tal como se usa en el presente documento se refiere a un acontecimiento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un ligando o receptor de Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad mediada por el complemento (CMC). En algunas descripciones, una función efectora es una que opera después de la unión de un antígeno, una que opera independientemente de la unión a antígeno, o ambas.

“Célula efectora” tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más funciones efectoras. En algunas descripciones, las células efectoras pueden incluir, pero pueden no limitarse a, uno o más de monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T, linfocitos B, y pueden ser de cualquier organismo incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

“Modificado por ingeniería genética” tal como se usa en el presente documento se refiere, en general, al aspecto de haberse manipulado por la mano del hombre. Por ejemplo, en algunas descripciones, un polinucleótido puede

considerarse “modificado por ingeniería genética” cuando dos o más secuencias, que no están ligadas entre sí en ese orden en la naturaleza, se manipulan por la mano del hombre para que se ligan directamente entre sí en el polinucleótido modificado por ingeniería genética. En algunas de tales descripciones particulares, un polinucleótido modificado por ingeniería genética puede comprender una secuencia reguladora que se encuentra en la naturaleza en asociación operativa con una primera secuencia codificante pero no en asociación operativa con una segunda secuencia codificante, se liga por la mano del hombre de modo que se asocia operativamente con la segunda secuencia codificante. Alternativa o adicionalmente, en algunas descripciones, primeras y segundas secuencias de ácido nucleico que codifican cada una para dominios o elementos de polipéptidos que en la naturaleza no se ligan entre sí pueden ligarse entre sí en un único polinucleótido modificado por ingeniería genética. De manera comparable, en algunas descripciones, una célula o un organismo puede considerarse “modificado por ingeniería genética” si se ha manipulado de modo que se altera su información genética (por ejemplo, se ha introducido nuevo material genético no presente previamente, o se ha alterado o retirado material genético presente previamente). Tal como es práctica común y entienden aquellos en la técnica, la progenie de una célula o un polinucleótido modificado por ingeniería genética todavía se denominan normalmente “modificada por ingeniería genética” aunque se realizó manipulación real en una entidad previa. Además, tal como apreciarán los expertos en la técnica, están disponibles una variedad de metodologías a través de las cuales puede lograrse “modificación por ingeniería genética” tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas descripciones, “modificado por ingeniería genética” puede implicar la selección o el diseño (por ejemplo, de secuencias de ácido nucleico, secuencias de polipéptido, células, tejidos y/u organismos) a través del uso de sistemas informáticos programados para realizar análisis o comparación, o de otro modo analizar, recomendar y/o seleccionar secuencias, alteraciones, etc). Alternativa o adicionalmente, en algunas descripciones, “modificación por ingeniería genética” puede implicar el uso de metodologías de síntesis química *in vitro* y/o tecnologías de ácido nucleico recombinantes tales como, por ejemplo, por ejemplo, amplificación de ácido nucleico [por ejemplo, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa], hibridación, mutación, transformación, transfección, etc., y/o cualquiera de una variedad de metodologías de apareamiento controlado). Tal como apreciarán los expertos en la técnica, se conocen bien en la técnica una variedad de tales técnicas establecidas (por ejemplo, para para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y transformación y cultivo de tejidos [por ejemplo, electroporación, lipofección, etc.] y se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y/o comentan en toda la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1989]).

“Epítipo”, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier resto que se reconoce específicamente por un componente de unión a inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpo o receptor). En algunas descripciones, un epítipo se compone de una pluralidad de grupos o átomos químicos en un antígeno. En algunas descripciones, tales grupos o átomos químicos tienen se exponen en superficie cuando el antígeno adopta una conformación tridimensional relevante. En algunas descripciones, tales grupos o átomos químicos están físicamente próximos entre sí en el espacio cuando el antígeno adopta una conformación de este tipo. En algunas descripciones, al menos algunos de tales átomos químicos son grupos que están físicamente separados entre sí cuando el antígeno adopta una conformación alternativa (por ejemplo, se linealiza).

“Excipiente”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente no terapéutico que puede incluirse en una composición farmacéutica, por ejemplo, para proporcionar o contribuir a una consistencia o un efecto de estabilización deseado. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares.

“Ligando de Fc” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc-ligando. Los ligandos de Fc incluyen, pero no se limitan a, Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16A), Fc γ RIIIB (CD16B), Fc γ RI (CD64), Fc ϵ RII (CD23), FcRn, Clq, C3, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y Fc γ R viral. Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

“Marcador fluorescente”, tal como se entiende en la técnica, es un resto o una entidad que tiene carácter fluorescente y, en algunas descripciones, puede detectarse basándose en tal fluorescencia. En algunas descripciones, un macador fluorescente puede ser o puede comprender uno o más de Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, renografina, ROX, TAMRA, TET, tetrametilrodamina y/o rojo Texas, entre otros.

“Marco” o “región de marco”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a las secuencias de una región variable menos las CDR. Dado que una secuencia de CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas, asimismo una secuencia de región de marco se somete a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR dividen las regiones de marco en las cadenas pesadas y ligeras en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 se posiciona entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, según lo denominado por otro, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina

sencilla que se produce de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, una FR representa una de las cuatro subregiones, FR1, por ejemplo, representa la primera región de marco más próxima al extremo amino terminal de la región variable y 5' con respecto a CDR1, y las FR representa dos o más de las subregiones que constituyen una región de marco.

5 "Célula huésped", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno (recombinante o de otro modo). Los expertos, tras leer esta divulgación, entenderán que tales términos se refieren no sólo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de una célula de este tipo. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido o bien a mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" tal como se usa en el presente documento. En algunas descripciones, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los reinos de vida que son adecuadas para expresar un ADN exógeno (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico recombinante). Las células a modo de ejemplo incluyen aquellas de procariotas y eucariotas (unicelulares o multicelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insecto (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas descripciones, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas descripciones, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO KI, DXB-1 1 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula retiniana, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3 A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas descripciones, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™).

"Anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, se pretende que incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes generadas (o ensambladas) a partir de secuencias de inmunoglobulina humana. En algunas descripciones, los anticuerpos (o componentes de anticuerpo) pueden considerarse "humanos" aunque sus secuencias de aminoácidos incluyan residuos o elementos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, incluyen variaciones de secuencia, por ejemplo, que pueden (originalmente) haberse introducido al azar, o mutagénesis específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en una o más CDR y en particular CDR3.

35 "Humanizado", tal como se conoce en la técnica, el término "humanizado" se usa comúnmente para referirse a anticuerpos (o componentes de anticuerpo) cuya secuencia de aminoácidos incluye secuencias de la región V_H y V_L de un anticuerpo de referencia producido en una especie no humana (por ejemplo, un ratón), pero también incluye modificaciones en aquellas secuencias relativas al anticuerpo de referencia destinadas a hacerlos más "humanos", es decir, más similares a las secuencias variables de línea germinal humana. En algunas descripciones, un anticuerpo (o componente de anticuerpo) "humanizado" es uno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno de interés y que tiene una región de marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos como la de un anticuerpo humano, y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos como la de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas de las regiones CDR se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, inmunoglobulina donante) y todas o sustancialmente todas de las regiones de marco son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En algunas descripciones, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una región constante de inmunoglobulina humana. En algunas descripciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir una región de C_H1, bisagra, C_H2, C_H3 y, opcionalmente, C_H4 de una región constante de cadena pesada. En algunas descripciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una región V_L humanizada. En algunas descripciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una región V_H humanizada. En algunas descripciones determinadas, un anticuerpo humanizado contiene regiones V_H y V_L humanizadas.

55 "Mejorar", "aumentar" o "reducir", tal como se usa en el presente documento o equivalentes gramaticales de los mismos, indican valores que son relativos para una medición de nivel inicial, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio de un tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "individuo de control" es un individuo afectado con la misma forma de enfermedad o lesión que el individuo que está tratándose.

60 "*In vitro*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a acontecimientos que se producen en un ambiente artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

“*In vivo*”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a acontecimientos que se producen dentro de un organismo multicelular, tal como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a acontecimientos que se producen dentro de una célula viva (a diferencia de, por ejemplo, sistemas *in vitro*).

5 “Aislado”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia y/o entidad que se ha (1) separado de al menos alguno de los componentes con los que se asoció cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) diseñado, producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%,
10 aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más de aproximadamente el 99% de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunas descripciones, los agentes aislados son aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o más de aproximadamente el 99% puros. Tal como se usa en el presente documento, una sustancia es “pura” si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas descripciones, tal como entenderán los expertos en la técnica, una sustancia todavía puede considerarse “aislada” o incluso “pura” después de haberse combinado con determinados otros componentes tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.); en tales descripciones, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir tales portadores o excipientes. Para dar un ejemplo, en algunas descripciones, un polímero biológico tal como un polipéptido o polinucleótido que se produce en la naturaleza se considera “aislado” cuando, a) en virtud de su origen o fuente de derivación no se asocia con algunos o todos de los
15 componentes que lo acompañan en su estado nativo en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie de la especie que lo produce en la naturaleza; c) se expresa por o está de otro modo en asociación con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Por tanto, por ejemplo, en algunas descripciones, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente del que lo produce en la naturaleza se considera un polipéptido “aislado”. Alternativa o adicionalmente, en algunas descripciones, un polipéptido que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido “aislado” en la medida que se ha separado de otros componentes a) con los que se asocia en la naturaleza; y/o b) con el que se asoció cuando se produjo inicialmente.

35 “ K_D ”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o componente de unión del mismo) de un complejo con su pareja (por ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo o componente de unión del mismo).

“ k_{off} ”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación para la disociación de un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o componente de unión del mismo) de un complejo con su pareja (por ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo o componente de unión del mismo).

40 “ k_{on} ”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de asociación para la asociación de un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o componente de unión del mismo) con su pareja (por ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo o componente de unión del mismo).

“Ligador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere normalmente a una porción de una molécula o entidad que conecta dos o más regiones de interés diferentes (por ejemplo, dominios o restos de interés
45 estructurales y/o funcionales particulares). En algunas descripciones, un ligador no participa significativamente en la función de interés relevante (por ejemplo, de modo que la presencia o ausencia del ligador, en asociación con el dominio o resto de interés relevante no altera significativamente la función relevante del dominio o resto). En algunas descripciones, un ligador es caracterizado por una falta de estructura definida o rígida. En algunas descripciones, particularmente cuando uno o más dominios o restos de interés se componen(n) de un polipéptido, un ligador es o comprende un polipéptido. En algunas descripciones particulares, un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido modificado por ingeniería genética) tal como se describe en el presente documento puede tener la estructura general S1-L-S2, en la que S1 y S2 son los restos o dominios de interés. En algunas descripciones, uno o ambos de S1 y S2 pueden ser o comprender un elemento de unión (por ejemplo, un componente de anticuerpo) tal como se describe en el presente documento. En algunas descripciones, un ligador polipeptídico puede ser de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
50 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos de longitud. En algunas descripciones, un ligador polipeptídico puede tener una secuencia de aminoácidos que es o comprende una secuencia tal como se describe en Holliger, P., *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 o Poljak, R. J., *et al.*, 1994, Structure 2: 1121-1123. En algunas descripciones, un ligador polipeptídico puede tener una secuencia de aminoácidos que es o comprende
60 GGGGSGGGGSGGGGS (es decir, $[G_4S]_3$) o GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (es decir, $[G_4S]_6$).

“Agente de unión multivalente”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de unión que

puede unirse a dos o más antígenos, que pueden estar en la misma molécula o en moléculas diferentes. Los agentes de unión multivalentes tal como se describe en el presente documento se modifican por ingeniería genética, en algunas descripciones, para tener los tres o más sitios de unión a antígeno, y normalmente son proteínas que no se producen de manera natural. Los agentes de unión multivalentes tal como se describe en el presente documento se refieren a agentes de unión que pueden unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Los agentes de unión multivalentes pueden componerse de múltiples copias de un solo componente de anticuerpo o múltiples copias de diferentes componentes de anticuerpo. Tales agentes de unión pueden unirse a dos o más antígenos y son agentes de unión tetravalentes o multivalentes. Los agentes de unión multivalentes pueden comprender adicionalmente un agente terapéutico, tal como, por ejemplo, un inmunomodulador, una toxina o una ARNasa. Los agentes de unión multivalentes tal como se describe en el presente documento pueden, en algunas descripciones, unirse simultáneamente a al menos dos dianas que son de estructura diferente, por ejemplo, dos antígenos diferentes, dos epítopos diferentes en el mismo antígeno, o un hapteno y/o un antígeno o epítipo. En muchas descripciones, los agentes de unión multivalentes son proteínas modificadas por ingeniería genética para tener características de agentes de unión multivalentes tal como se describe en el presente documento. Los agentes de unión multivalentes pueden ser monoespecíficos (pueden unirse a un antígeno) o multiespecíficos (pueden unirse a dos o más antígenos), y pueden componerse de dos polipéptidos de cadena pesada y dos polipéptidos de cadena ligera. Cada sitio de unión, en algunas descripciones, se compone de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de seis CDR implicadas en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno.

“Ácido nucleico”, tal como se usa en el presente documento, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica. En algunas descripciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o una sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica por medio de una unión fosfodiéster. Tal como resultará evidente a partir del contexto, en algunas descripciones, “ácido nucleico” se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas descripciones, “ácido nucleico” se refiere a una cadena oligonucleotídica que comprende residuos de ácido nucleico individuales. En algunas descripciones, un “ácido nucleico” es o comprende ARN; en algunas descripciones, un “ácido nucleico” es o comprende ADN. En algunas descripciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más residuos de ácidos nucleicos naturales. En algunas descripciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de ácido nucleico. En algunas descripciones, un análogo de ácido nucleico difiere de un ácido nucleico en que no utiliza una estructura principal de fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas descripciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más “ácidos nucleicos peptídicos”, que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la estructura principal. Alternativa o adicionalmente, en algunas descripciones, un ácido nucleico tiene una o más uniones de fosforotioato y/o 5'-N-fosforamidita en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunas descripciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). En algunas descripciones, un ácido nucleico es, comprende o consiste en uno o más análogos de nucleósido (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas, y combinaciones de las mismas). En algunas descripciones, un ácido nucleico comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa) en comparación con aquellos en ácidos nucleicos naturales. En algunas descripciones, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico funcional tal como un ARN o una proteína. En algunas descripciones, un ácido nucleico incluye uno o más intrones. En algunas descripciones, se preparan ácidos nucleicos mediante uno o más de aislamiento de una fuente natural, síntesis enzimática mediante polimerización basada en un molde complementario (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en un sistema o una célula recombinante y síntesis química. En algunas descripciones, un ácido nucleico es al menos de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de longitud. En algunas descripciones, un ácido nucleico es monocatenario; en algunas descripciones, un ácido nucleico es bicatenario. En algunas descripciones, un ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica para, o es el complemento de una secuencia que codifica para un polipéptido. En algunas descripciones, un ácido nucleico tiene actividad enzimática.

“Ligado operativamente”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia de control “ligada operativamente” a una secuencia codificante se liga de tal modo que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias “ligadas operativamente” incluyen tanto secuencias de control de la expresión que están contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término “secuencia de control de la expresión” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que se ligan. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio, terminación, promotoras y

potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere según el organismo huésped. Por ejemplo, en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosómico y secuencia de terminación de la transcripción, mientras que en eucariotas, normalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" se pretende que incluya componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y que también incluya componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión.

"Ion paramagnético", tal como se entiende en la técnica, se refiere a un ion con carácter paramagnético. En algunas descripciones, un ion paramagnético es uno o más de cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III), lantano (III), oro (III), plomo (II) y/o bismuto (III).

"Carga útil", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto o una entidad que se administra a un sitio de interés (por ejemplo, a una célula, un tejido, tumor u organismo) mediante asociación con otra entidad. En algunas descripciones, una carga útil es o comprende un agente de detección. En algunas descripciones, una entidad de carga útil es o comprende un agente terapéutico. En algunas descripciones, una entidad de carga útil es o comprende un agente catalítico. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que una entidad de carga útil puede ser de cualquier clase química. Por ejemplo, en algunas descripciones, una entidad de carga útil puede ser o comprender un hidrato de carbono, un isótopo, un lípido, un ácido nucleico, un metal, una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula cerámica o polimérica), un polipéptido, una molécula pequeña, un virus, etc. Para dar algunos ejemplos, en algunas descripciones, una carga útil de agente terapéutico puede ser o comprender una toxina (por ejemplo, un péptido, una molécula pequeña o un isótopo [por ejemplo, radioisótopo] tóxico); en algunas descripciones, una carga útil de agente de detección puede ser o comprender un agente o una entidad fluorescente, un agente o una entidad radiactiva, un agente o una entidad que puede detectarse mediante unión (por ejemplo, una etiqueta, un hapteno, un ligando, etc.), un agente catalítico, etc.

"Condiciones fisiológicas", tal como se usa en el presente documento, tiene su significado entendido en la técnica que hace referencia a condiciones en las que las células o los organismos viven y/o se reproducen. En algunas descripciones, el término se refiere a condiciones del medio externo o interno que pueden producirse en la naturaleza para un organismo o sistema celular. En algunas descripciones, las condiciones fisiológicas son aquellas condiciones presentes dentro del cuerpo de un ser humano o animal no humano, especialmente aquellas condiciones presentes en y/o dentro de un sitio quirúrgico. Las condiciones fisiológicas incluyen normalmente, por ejemplo, un intervalo de temperatura de 20 a 40°C, presión atmosférica de 1, pH de 6 a 8, concentración de glucosa de 1 a 20 mM, concentración de oxígeno a niveles atmosféricos y gravedad tal como se encuentra en la Tierra. En algunas descripciones, las condiciones en un laboratorio se manipulan y/o mantienen en condiciones fisiológicas. En algunas descripciones, las condiciones fisiológicas se encuentran en un organismo.

"Polipéptido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. En algunas descripciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se produce en la naturaleza. En algunas descripciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza. En algunas descripciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se modifica por ingeniería genética en que se diseña y/o produce a través de la acción de la mano del hombre. En algunas descripciones, un polipéptido puede comprender o consistir en aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, o ambos. En algunas descripciones, un polipéptido puede comprender o consistir en sólo aminoácidos naturales o sólo aminoácidos no naturales. En algunas descripciones, un polipéptido puede comprender D-aminoácidos, L-aminoácidos, o ambos. En algunas descripciones, un polipéptido puede comprender sólo D-aminoácidos. En algunas descripciones, un polipéptido puede comprender sólo L-aminoácidos. En algunas descripciones, un polipéptido puede incluir uno o más grupos laterales u otras modificaciones, por ejemplo, modificantes o unidos a una o más cadenas laterales de aminoácido, en el extremo N-terminal del polipéptido, en el extremo C-terminal del polipéptido, o cualquier combinación de los mismos. En algunas descripciones, tales modificaciones o grupos colgantes pueden seleccionarse del grupo que consiste en acetilación, amidación, lipidación, metilación, pegilación, etc., incluyendo combinaciones de los mismos. En algunas descripciones, un polipéptido puede ser cíclico y/o puede comprender una porción cíclica. En algunas descripciones, un polipéptido no es cíclico y/o no comprende ninguna porción cíclica. En algunas descripciones, un polipéptido es lineal. En algunas descripciones, un polipéptido puede ser o comprender un polipéptido grapado. En algunas descripciones, el término "polipéptido" puede añadirse a un nombre de un polipéptido, una actividad o estructura de referencia; en tales casos se usa en el presente documento para referirse a polipéptidos que comparten la actividad o estructura relevante y, por tanto, pueden considerarse miembros de la misma clase o familia de polipéptidos. Para cada clase de este tipo, la presente memoria descriptiva proporciona y/o los expertos en la técnica serán conscientes de polipéptidos a modo de ejemplo dentro de la clase cuyas secuencias de aminoácidos y/o funciones se conocen; en algunas descripciones, tales polipéptidos a modo de ejemplo son polipéptidos de referencia para la clase de polipéptido. En algunas descripciones, un miembro de una clase o familia de polipéptidos muestra homología o identidad de secuencia significativa con, comparte un motivo de secuencia común (por ejemplo, un elemento de secuencia característico) con y/o comparte una actividad común (en

algunas descripciones a un nivel comparable o dentro de un intervalo designado) con un polipéptido de referencia de la clase; en algunas descripciones con todos los polipéptidos dentro de la clase). Por ejemplo, en algunas descripciones, un polipéptido miembro muestra un grado global de homología o identidad de secuencia con un polipéptido de referencia que es al menos de aproximadamente el 30 al 40%, y a menudo es mayor de aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más y/o incluye al menos una región (es decir, una región conservada que puede, en algunas descripciones, puede ser o comprender un elemento de secuencia característico) que muestra identidad de secuencia muy alta, a menudo mayor del 90% o incluso el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%. Una región conservada de este tipo abarca habitualmente al menos de tres a cuatro y a menudo hasta 20 o más aminoácidos; en algunas descripciones, una región conservada abarca al menos un tramo de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos contiguos. En algunas descripciones, un polipéptido útil puede comprender o consistir en un fragmento de un polipéptido parental. En algunas descripciones, un polipéptido útil que puede comprender o consistir en una pluralidad de fragmentos, se encuentra cada uno de los cuales en el mismo polipéptido parental en una disposición espacial diferente con respecto a otra que se encuentra en el polipéptido de interés (por ejemplo, los fragmentos que se ligan directamente en el polipéptido parental pueden separarse espacialmente en el polipéptido de interés o viceversa y/o los fragmentos pueden estar presentes en un orden diferente en el polipéptido de interés que en el polipéptido parental), de modo que el polipéptido de interés es un derivado de su polipéptido parental.

“Prevenir” o “prevención”, tal como se usa en el presente documento cuando se usa en relación con la aparición de una enfermedad, un trastorno y/o estado, se refiere a la reducción del riesgo de desarrollar la enfermedad, el trastorno y/o estado y/o a retrasar la aparición de una o más características o síntomas de la enfermedad, el trastorno o estado. La prevención puede considerarse completa cuando la aparición de una enfermedad, un trastorno o estado se ha retrasado un periodo predefinido de tiempo.

“Isótopo radiactivo”: el término “isótopo radiactivo” tal como se usa en el presente documento tiene su significado entendido en la técnica que hace referencia a un isótopo que experimenta desintegración radiactiva. En algunas descripciones, un isótopo radiactivo puede ser o comprender uno o más de actinio-225, astatina-211, bismuto-212, carbono-14, cromo-51, cloro-36, cobalto-57, cobalto-58, cobre-67, Europio-152, galio-67, hidrógeno-3, yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131, indio-111, hierro-59, plomo-212, lutecio-177, fósforo-32, radio-223, radio-224, renio-186, renio-188, selenio-75, azufre-35, tecnecio-99m, torio-227, itrio-90 y zirconio-89.

“Recombinante”, tal como se usa en el presente documento, se pretende que se refiera a polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos o componentes de anticuerpo, o agentes de unión multispecíficos tal como se describe en el presente documento) que se diseñan, modifican por ingeniería genética, preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como polipéptidos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, polipéptidos aislados de una biblioteca combinatoria recombinante de polipéptidos humanos (Hoogenboom H. R., 1997, TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W. E., 2002, Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo, J. V. y Larrick, J. W., 2002, BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H., y Chames, P., 2000, Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L. D. *et al.*, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Little M. *et al.*, 2000, Immunology Today 21:364-370; Kellermann S-A., y Green L. L., 2002, Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Murphy, A.J. *et al.*, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158) o polipéptidos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implica el corte y empalme de elementos de secuencia seleccionados entre sí. En algunas descripciones, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados se encuentra en la naturaleza. En algunas descripciones, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados se diseñan *in silico*. En algunas descripciones, uno o más de tales elementos de secuencia seleccionados resulta de mutagénesis (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, por ejemplo, de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, en algunas descripciones, un polipéptido de anticuerpo recombinante se compone de secuencias encontradas en la línea germinal de un organismo fuente de interés (por ejemplo, humano, ratón, etc.). En algunas descripciones, un anticuerpo recombinante tiene una secuencia de aminoácidos que resultó de mutagénesis (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en un animal transgénico), de modo que las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se originan de y se relacionan con las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de anticuerpos de la línea germinal *in vivo*.

“Recuperación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al procedimiento de hacer que un agente o una entidad esté sustancialmente libre de otros componentes asociados previamente, por ejemplo, mediante aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación conocidas en la técnica. En algunas descripciones, un agente o una entidad se recupera de una fuente natural y/o una fuente que comprende células.

“Referencia”, tal como se usa en el presente documento, describe un patrón, control u otra referencia apropiada frente a la que se realiza una comparación tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas descripciones, una referencia es un patrón o agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia, serie de etapas, conjunto de condiciones o valor de control frente al que se compara un agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia, serie de etapas, conjunto de condiciones o valor de interés. En algunas descripciones, una referencia se somete a prueba y/o determina sustancialmente de manera simultánea con las pruebas o la

determinación de interés. En algunas descripciones, una referencia es una referencia histórica, opcionalmente realizada en un medio tangible. Normalmente, tal como entenderían los expertos en la técnica, una referencia se determina o caracteriza en condiciones comparables a aquellas utilizadas en la evaluación de interés.

5 “Riesgo”, tal como se entenderá a partir del contexto, “riesgo” de una enfermedad, un trastorno y/o estado comprende la probabilidad de que un individuo particular desarrolle una enfermedad, un trastorno y/o estado (por ejemplo, una lesión por radiación). En algunas descripciones, el riesgo se expresa como un porcentaje. En algunas descripciones, el riesgo es de desde el 0, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90 y hasta el 100%. En algunas descripciones, el riesgo se expresa como un riesgo relativo a un riesgo asociado con una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia. En algunas descripciones, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia tienen un riesgo conocido de una enfermedad, un trastorno, estado y/o acontecimiento (por ejemplo, una lesión por radiación). En algunas descripciones, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia son de individuos comparables con un individuo particular. En algunas descripciones, el riesgo relativo es de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

15 “Unión específica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un agente de unión para discriminar entre posibles parejas en el ambiente en el que va a producirse la unión. Un agente de unión que interacciona con una diana particular cuando están presentes otras dianas potenciales se dice que “se une específicamente” a la diana con la que interacciona. En algunas descripciones, la unión específica se evalúa detectando o determinando el grado de asociación entre el agente de unión y su pareja; en algunas descripciones, la unión específica se evalúa detectando o determinando el grado de disociación de un complejo agente de unión-pareja; en algunas descripciones, la unión específica se evalúa detectando o determinando la capacidad del agente de unión de competir una interacción alternativa entre su pareja y otra entidad. En algunas descripciones, la unión específica se evalúa realizando tales detecciones o determinaciones en todo un intervalo de concentraciones.

25 “Sujeto”, tal como se usa en el presente documento, significa cualquier mamífero, incluyendo seres humanos. En determinadas descripciones, el sujeto es un adulto, un adolescente o un lactante. En algunas descripciones, los términos “individuo” o “paciente” se usan y se pretende que sean intercambiables con “sujeto”. También se contemplan la administración de las composiciones farmacéuticas y/o el rendimiento de los métodos de tratamiento en el útero.

30 “Sustancialmente”: tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente” se refiere a la condición cualitativa de presentar el punto o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si es que lo hacen, se completan y/o avanzan hasta su finalización o logran o evitan un resultado absoluto. Por tanto, el término “sustancialmente” se usa en el presente documento para capturar la posible falta de finalización inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

35 “Homología de secuencia sustancial”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una comparación entre secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos. Tal como apreciarán los expertos habituales en la técnica, dos secuencias se consideran generalmente “sustancialmente homólogas” si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, tal como conocen bien los expertos habituales en la técnica, determinados aminoácidos se clasifican normalmente como aminoácidos “hidrófobos” o “hidrófilos” y/o como que tienen cadenas laterales “polares” o “apolares”. La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tiempo puede considerarse a menudo una sustitución “homóloga”. Las categorizaciones de aminoácidos típicas se resumen en la tabla 1 y 2.

TABLA 1

Alanina	Ala	A	Apolar	Neutro	1,8
Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	Apolar	Neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	Apolar	Neutro	-0,4
Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	Apolar	Neutro	4,5
Leucina	Leu	L	Apolar	Neutro	3,8
Lisina	Lys	K	Polar	Positivo	-3,9
Metionina	Met	M	Apolar	Neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	Apolar	Neutro	2,8
Prolina	Pro	P	Apolar	Neutro	-1,6
Serina	Ser	S	Polar	Neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	Polar	Neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	Apolar	Neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro	-1,3
Valina	Val	V	Apolar	Neutro	4,2

TABLA 2

Aminoácidos ambiguos	De 3 letras	De 1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

- 5 Tal como se conoce bien en esta técnica, pueden compararse secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo aquellos disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Se describen tales programas a modo de ejemplo en Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410; Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-80; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Baxevanis *et al.*, 1998, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley; y Misener *et al.*, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 132)*, Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente proporcionan normalmente una indicación del grado de homología. En algunas descripciones, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o más de sus residuos correspondientes son homólogos a lo largo de un tramo relevante de residuos. En algunas descripciones, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas descripciones, el tramo relevante es de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300, al menos 325, al menos 350, al menos 375, al menos 400, al menos 425, al menos 450, al menos 475, al menos 500 o más residuos.

“Identidad sustancial”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una comparación entre secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos. Tal como apreciarán los expertos habituales en la técnica, dos secuencias se consideran, en general, “sustancialmente idénticas” si contienen residuos idénticos en posiciones correspondientes. Tal como se conoce bien en esta técnica, pueden compararse secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos usando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluyendo aquellos disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Se describen tales programas a modo de ejemplo en Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410; Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-80; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Baxevanis *et al.*, 1998, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley; y Misener *et al.*, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 132)*, Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente proporcionan normalmente una indicación del grado de identidad. En algunas descripciones, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más de sus residuos correspondientes son idénticos a lo largo de un tramo relevante de residuos. En algunas descripciones, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas descripciones, el tramo relevante es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos. En el contexto de una CDR, la referencia a “identidad sustancial” se refiere normalmente a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% idéntica a la de una CDR de referencia.

“Resonancia de plasmón superficial”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones de unión específica en tiempo real, por ejemplo, a través de la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor, tal como mediante el uso un sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véase Jonsson, U., *et al.*, 1993, *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., *et al.*, 1991, *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.*, 1995, *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., *et al.*, 1991, *Anal. Biochem.* 198:268-277.

“Cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, quiere decir una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. En algunas descripciones, el término se refiere a una cantidad que es suficiente, cuando se administra a una población que padece o es sensible a una enfermedad, un trastorno y/o estado según una pauta posológica terapéutica, para tratar la enfermedad, el trastorno y/o estado. En algunas descripciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una que reduce la frecuencia y/o gravedad de, y/o retrasa la aparición de, uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno y/o estado. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que el término “cantidad terapéuticamente eficaz” no requiere, de hecho, que se logre tratamiento exitoso en un individuo particular. Más bien, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser aquella cantidad que proporciona una respuesta farmacológica deseada particular en un número significativo de sujetos cuando se administra a pacientes que necesitan tal tratamiento. En algunas descripciones, la referencia a una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una referencia a una cantidad tal como se mide en uno o más tejidos (por ejemplo, un tejido afectado por la enfermedad, el trastorno o estado) o líquidos (por ejemplo, sangre, saliva, suero, sudor, lágrimas, orina, etc.) específicos. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que, en algunas descripciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o una terapia particular puede formularse y/o administrarse en una sola dosis. En algunas descripciones, un agente terapéuticamente eficaz puede formularse y/o administrarse en una pluralidad de dosis, por ejemplo, como parte de una pauta posológica.

“Transformación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier procedimiento mediante el cual se introduce ADN exógeno en una célula huésped. La transformación puede producirse en condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico foráneas en una célula huésped procarionta o eucariota. En algunas descripciones, una metodología de transformación particular se selecciona basándose en la célula huésped que va a transformarse y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, apareamiento, lipofección. En algunas descripciones, una célula “transformada” se transforma de manera estable en que el ADN insertado puede realizar replicación o bien como un plásmido de replicación autónoma o bien como parte del cromosoma huésped. En algunas descripciones, una célula transformada expresa de manera transitoria ácido nucleico introducido durante periodos limitados de tiempo.

“Vector”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden realizar replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que se ligan de manera operativa. Tales vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

Descripción detallada

La presente descripción demuestra la construcción satisfactoria de un agente de unión multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) que se une a un antígeno establecido en cánceres colorrectales humanos. En particular, la presente divulgación demuestra específicamente el direccionamiento satisfactorio de radioinmunoterapia en cáncer colorrectal usando un anticuerpo biespecífico que se une al antígeno de glicoproteína A33 humano y ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA-Bn), proporciona un anticuerpo biespecífico de este tipo específico y demuestra su sorprendente utilidad y/o eficacia.

Entre otras cosas, la presente descripción proporciona específicamente el primer uso terapéutico satisfactorio de un anticuerpo biespecífico que selecciona como diana el antígeno A33 humano, y además proporciona una metodología terapéutica mejorada para un régimen de radioinmunoterapia dirigido previamente para el tratamiento de tumores que expresan A33. También se describen agentes "teranósticos" (es decir, terapéuticos y de diagnóstico) para la obtención de imágenes gammagráficas y radioinmunoterapia simultáneas de cánceres positivos para A33, y demuestra específicamente una sorprendente utilidad y/o eficacia de los mismos.

El A33, un antígeno de glicoproteína en cánceres colorrectales humanos con expresión en tejido normal restringida, se retiene sobre la superficie de la célula tumoral después de la unión al anticuerpo durante periodos de tiempo prolongados, a diferencia de la rápida renovación fisiológica del epitelio intestinal normal, un índice terapéutico basado en la retención tisular único de los antígenos intestinales. La radioinmunogammagrafía y la radioinmunoterapia (RIT) de cáncer colorrectal avanzado ("CCR") que usa anticuerpos directamente conjugados (por ejemplo ¹³¹I-huA33) ha proporcionado una dosis tumoral subóptima y un índice terapéutico (Welt *et al.*, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1561-1571). La presente descripción reconoce que ambas de estas deficiencias pueden superarse usando un enfoque de RIT dirigida previamente (PRIT) de múltiples etapas en el que un constructo biespecífico de anticuerpo biespecífico huA33-C825 tetravalente con alta afinidad por complejos ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"-tetraacético (DOTA-Bn)-radiometal se dirige en primer lugar al tumor. La presente divulgación demuestra específicamente que, tras el aclaramiento de anticuerpo biespecífico huA33-C825 no unido de la circulación, se inyecta hapteno de DOTA-Bn radiomarcado con ¹⁷⁷Lu para administrar la dosis tumoricida de PRIT al tumor positivo para A33. Para dar un ejemplo específico, la presente divulgación demuestra que en modelos de tumor colorrectal humano de SW1222, los ratones con tumores subcutáneos establecidos pueden curarse con toxicidad mínima para tejidos normales incluyendo médula ósea y riñón.

Sin desear limitare a la teoría, se observa que los datos proporcionados en el presente documento demuestran que, en algunas descripciones, un régimen de PRIT que emplea una dosis de ciclo dual de un anticuerpo biespecífico huA33-C825 dio como resultado un efecto tremendo sobre el volumen tumoral en comparación con el mismo régimen de PRIT que empleó una dosis de un solo ciclo. Además, la presente divulgación demuestra, entre otras cosas, que tal dosificación de ciclo dual de un anticuerpo biespecífico huA33-C825 tal como se describe en el presente documento produjo una respuesta completa en aproximadamente el 80% de los sujetos de prueba. También se demuestran en el presente documento tratamientos con ciclos adicionales, que mostraron respuestas altamente eficaces, por ejemplo, un régimen de dosificación de 3 ciclos fue curativo para 10/10 ratones sin toxicidad detectable en órganos diana (médula bazo y riñón). Por tanto, la presente divulgación, en al menos algunas descripciones, abarca el desarrollo de un régimen de PRIT mejorado usando un formato de anticuerpo biespecífico que selecciona como diana eficazmente el antígeno de glicoproteína A33 humano para lograr direccionamiento tumoral y/o extirpación tumoral potenciados con toxicidad por radiación clínica o histológica mínima o nula.

Cáncer colorrectal humano

El antígeno A33 humano es una glicoproteína transmembrana que tiene un peso molecular de 43 kD (polipéptido de 213 aminoácidos), y se expresa en más del 95% de cánceres de colon humano con expresión normal restringida (epitelio de colon e intestino) y excreción mínima en la circulación. Inicialmente, se desarrolló un anticuerpo monoclonal murino (A33) y después una versión humanizada (huA33) (King *et al.*, 1995, British J. Cancer 72:1364-1372), y se encontró que tenía propiedades de internalización y captación de anticuerpo-antígeno, afinidad y especificidad ideales para su uso como agente de direccionamiento para radioisótopos para diagnóstico y terapia. En un estudio clínico de obtención de imágenes con ¹²⁴I-huA33 en pacientes con cáncer colorrectal, el aclaramiento diferencial entre el tumor positivo para el antígeno y el intestino condujo a los autores a concluir que puede preferirse un enfoque de múltiples etapas alternativo que incluye la administración inicial con una forma no radiactiva de anticuerpo A33 biespecífico (o "direccionamiento previo"), seguido con un hapteno radiomarcado (O'Donoghue *et al.*, 2011, J. Nucl. Med. 52:1878-1885). La alta persistencia tumoral de formas de yodo radiactivo de A33 (por ejemplo, ¹²⁵I-A33) provocó una investigación extensiva de las propiedades de internalización del complejo anticuerpo-antígeno A33, mostrando que los anticuerpos anti-A33 residen en la superficie durante periodos de tiempo prolongados, haciendo que un anticuerpo de este tipo, en algunas descripciones, sea particularmente adecuado para un enfoque de direccionamiento previo (Ackerman *et al.*, 2008, Mol. Cancer Ther. 7(7):2233-2240), en particular, cuando se permite que la expresión normal en el intestino se renueve antes de una última etapa con ligando. La fisiología única del epitelio intestinal que se excreta a lo largo de uno a tres días portando con él antígenos y anticuerpos unidos es crítica si el antígeno diana se expresa en estas células normales (Scott *et al.*, 2005, Clin. Cancer Res. 11:4810-4817). Tal como se describe en el presente documento, en PRIT, los anticuerpos no unidos se someten a aclaramiento de la sangre usando un agente de aclaramiento (CA) antes de una última

etapa con ligando citotóxico. La excreción natural de células intestinales normales es funcionalmente equivalente a una etapa de aclaramiento en el intestino. Se ha investigado la radioinmunoterapia dirigida previamente (PRIT) dirigida a una variedad de otros antígenos asociados a tumor para el cáncer colorrectal, incluyendo CEA (hMN-14-anti-DTPA-indio + hapteno de ¹³¹I-di-DTPA-indio y, recientemente, anti-CEACAM5-anti-histamina-succinil-glicina "TF2" con hapteno de ¹⁷⁷Lu-IMP288), TAG-72 (CC49 scFv-estreptavidina + ⁹⁰Y-DOTA-biotina), Ep-CAM (NR-LU-10-SA con ⁹⁰Y-DOTA-biotina).

Hasta ahora, el uso de anticuerpos para dirigir toxinas a tumores, por ejemplo, radioinmunoterapia (RIT) con anticuerpos directamente conjugados, ha tenido un éxito limitado debido, en parte, a la dosis tumoral subóptima y al índice terapéutico (IT). Además, debido a la toxicidad por vecindad del tejido normal, el aumento gradual de dosis no es factible y, por tanto, tal terapia da como resultado un efecto antitumoral limitado. Por tanto, la presente descripción se basa en el reconocimiento de que debido a que el antígeno de glicoproteína A33 humano está presente en cánceres colorrectales y posee propiedades de retención únicas, pudo desarrollarse una metodología de PRIT que logra un IT superior en veces logarítmicas y remisiones completas de xenoinjertos establecidos sin toxicidad para ningún órgano principal para seleccionar como diana eficazmente A33 humano en células tumorales usando un anticuerpo biespecífico (denominado en el presente documento huA33-C825) que tiene un primer sitio de unión a antígeno que se une a A33 humano y un segundo sitio de unión a antígeno con alta afinidad por el complejo DOTA-Bn (metal) (por ejemplo, especificidad a través del Fv de cadena sencilla (scFv) denominado C825). Tal como se describe en el presente documento, una metodología de PRIT se mejoró *in vivo* valorando dosis de huA33-C825, un agente de aclaramiento a base de dextrano (dextrano-CA) y un hapteno de DOTA-Bn radiomarcado con ¹⁷⁷Lu (¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn) usando un modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal subcutáneo de SW1222.

Tal como se describe en el presente documento, los agentes de unión biespecíficos de la presente descripción ofrecen funcionalidad dual en obtención de imágenes de diagnóstico/dosimetría y aplicaciones terapéuticas. La radioterapia dirigida, denominada radioinmunoterapia (RIT), puede administrar suficiente radiación para superar cualquier resistencia tumoral, siempre que el IT sea favorable. Los fármacos de IgG radiomarcados actuales (por ejemplo, ⁹⁰Y-Zevalin) tienen un IT subóptimo de 3:1, en el límite para la terapia curativa en la que la toxicidad hematológica es limitante de dosis. La presente descripción reconoce que en RIT dirigida previamente (PRIT), una etapa de selección como diana de anticuerpo es independiente de la etapa de carga útil. La presente divulgación aprecia una posible ventaja adicional de PRIT con respecto a RIT convencional en que, en algunas descripciones, PRIT puede facilitar el cuidado del paciente. En algunas descripciones, una infusión inicial de anticuerpo frío, y en algunas descripciones una administración de un agente de aclaramiento, puede realizarse en el despacho de un médico (por ejemplo, en el despacho de un médico gerente). En algunas descripciones, sólo sería necesario realizar una etapa con DOTA-Bn radiomarcado (realizada normalmente tras una o más, y en algunas descripciones, todas, de las demás etapas), por un médico cualificado en medicina nuclear, y el paciente puede volver entonces al cuidado de su médico, una vez que la radiactividad se haya aclarado del organismo (<24 horas). Por tanto, aprovechando la farmacocinética única de ligandos grandes y pequeños, los presentes inventores demuestran en el presente documento que la PRIT puede ser altamente eficaz. La presente descripción demuestra específicamente que el uso de un sistema de PRIT totalmente humanizado que aprovecha DOTA-Bn (Bn=bencilo) tiene un potencial curativo significativo en un modelo de xenoinjerto de ratón. A medida que los IT mejoran en >10 veces, no se observa ninguna toxicidad clínica o histológica. Como agentes teranósticos, la dosimetría de PRIT usando o bien PET o bien SPECT ha producido estimaciones de dosis altamente reproducibles. Aunque los radioisótopos proporcionan prueba inicial de principio, la PRIT puede aplicarse a cualquier carga útil ligada a DOTA-Bn, incluyendo nanopartículas, péptidos, toxinas, fármacos y virus. Los presentes inventores han aplicado su método de PRIT para seleccionar como diana el antígeno A33 humano debido a su alta mortalidad en los Estados Unidos. Por ejemplo, los tumores positivos para A33 están implicados en alta mortalidad en cáncer colorrectal (49700 muertes anuales), cáncer gástrico (10720 muertes anuales) y cáncer pancreático (39590 muertes anuales). Actualmente, no hay disponible ninguna terapia curativa para ninguno de estos cánceres metastásicos.

Tal como se describe en el presente documento, los presentes inventores han desarrollado un anticuerpo biespecífico denominado huA33-C825 usando las secuencias de región variable del anticuerpo humanizado A33 (King *et al.*, 1995, Brit. J. Cancer 72:1364-1372) y C825, un anticuerpo de scFv murino con alta afinidad por complejos ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA-Bn)-radiometal (Orcutt *et al.*, 2011, Nucl. Med. Biol. 38:223-233), para demostrar una metodología de PRIT mejorada en ratones que portan xenoinjertos de carcinoma colorrectal humano SW1222 s.c. establecidos. Se observa que los datos proporcionados en el presente documento demuestran específicamente que el uso de una PRIT mejorada de este tipo tal como se describe en el presente documento proporciona razones de tumor con respecto a tejidos normales de 105:1 (sangre) y 18:1 (riñón) a las 24 horas (h) tras la inyección (p.i.). Además, tal como se describe en el presente documento, la biodistribución de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn a partir de 2-120 h p.i., las dosis absorbidas estimadas (cGy/MBq) para tumor, sangre, hígado, bazo y riñón para PRIT fueron 65,8, 0,9 (índice terapéutico (IT): 73), 6,3 (IT: 10), 6,6 (IT: 10) y 5,3 (IT: 12), respectivamente. Por tanto, en algunas descripciones, el régimen de PRIT que emplea el anticuerpo biespecífico huA33-C825 descrito en el presente documento proporciona un índice terapéutico mejorado y una dosis tumoral óptima en el tratamiento de un xenoinjerto colorrectal humano. También se observa que los datos proporcionados en el presente documento demuestran específicamente que el tratamiento de PRIT de ciclo dual (66,6 ó 111 MBq de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn, véase la tabla 7) de tumores establecidos produjo 9/9 respuestas completas y 2/9 vivos sin recaída a más de 140 d. Además, en los otros 7, el tiempo hasta alcanzar un tamaño tumoral de 500

mm³ fueron de 27 ± 26 d para 66,6 MBq y 40 ± 6 d para 111 MBq, en comparación con 13 ± 2 d para ratones no tratados. No hubo ninguna evidencia clínica o histológica de toxicidades inducidas por radiación. Por tanto, los datos proporcionados en el presente documento confirma que los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento representan opciones terapéuticas contra el cáncer caracterizadas por perfiles de seguridad y eficacia mejorados, y un enfoque de PRIT de múltiples etapas, tal como se describe en el presente documento, podría proporcionar radiación segura y eficaz usando el isótopo ¹⁷⁷Lu emisor de β para extirpar tumores colorrectales establecidos.

Anticuerpos humanizados

En algunas descripciones, los anticuerpos para su uso según la presente descripción son anticuerpos monoclonales, y/o en algunas descripciones pueden ser versiones humanizadas de anticuerpos anti-A33 relacionados que se prepararon en otras especies. En algunas descripciones, un anticuerpo humanizado es uno en el que algunos o todos de los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no se requieren para la unión al antígeno (por ejemplo, las regiones constantes y las regiones de marco de los dominios variables) se usan para sustituir los aminoácidos correspondientes de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo no humano relacionado. A modo de ejemplo, una versión humanizada de un anticuerpo murino para un antígeno dado tiene en ambas de sus cadenas pesada y ligera (1) regiones constantes de un anticuerpo humano; (2) regiones de marco de los dominios variables de un anticuerpo humano; y (3) CDR del anticuerpo murino. En algunas descripciones, uno o más residuos en las regiones de marco humanas pueden cambiarse por residuos en las posiciones correspondientes en el anticuerpo murino para conservar la afinidad de unión del anticuerpo humanizado por el antígeno. Un cambio de este tipo a veces se denomina "mutación inversa". De manera similar, pueden realizarse mutaciones directas para volver a la secuencia murina por un motivo deseado, por ejemplo, estabilidad o afinidad por el antígeno. Los anticuerpos humanizados son generalmente menos propensos a provocar una respuesta inmunitaria en seres humanos en comparación con anticuerpos humanos quiméricos debido a que los primeros contienen considerablemente menos componentes no humanos.

En algunas descripciones, un anticuerpo humanizado se produce mediante tecnología de ADN recombinante. Alternativa o adicionalmente, se describen métodos adecuados para elaborar anticuerpos humanizados de la presente descripción en, por ejemplo, el documento EP0239400; Jones *et al.*, 1986, Nature 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, Science 239:1534-1536; Queen *et al.*, 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029; patente estadounidense n.º 6.180.370; y Orlandi *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833. Generalmente, el trasplante de CDR murinas (u otras no humanas) en un anticuerpo humano se logra de la siguiente manera. Los ADNc que codifican para dominios variables de cadena pesada y ligera se aíslan de un hibridoma. Las secuencias de ADN de los dominios variables, incluyendo las CDR, se determinan mediante secuenciación. Los ADN, que codifican para las CDR, se insertan en las regiones correspondientes de secuencias codificantes de dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo humano, unidas a segmentos génicos de la región constante humana de un isotipo deseado (por ejemplo, γ1 para C_H y κ para C_L), se someten a síntesis génica. Los genes de cadena pesada y ligera humanizados se expresan conjuntamente en células huésped de mamífero (por ejemplo, células CHO o NSO) para producir anticuerpo humanizado soluble. Para facilitar la producción a gran escala de anticuerpos, a menudo es deseable seleccionar un expresor alto usando un gen DHFR o gen GS en la línea productora. Estas líneas celulares productoras se cultivan en biorreactores, o un sistema de cultivo de fibras huecas, o tecnología WAVE, para producir cultivos a granel de anticuerpo soluble, o para producir mamíferos transgénicos (por ejemplo, cabras, vacas u ovejas) que expresan el anticuerpo en la leche (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.827.690).

Tal como se describe en el presente documento, se modificaron por ingeniería genética agentes de unión multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) utilizando secuencias y/o componentes encontrados en el anticuerpo A33 humanizado descrito en King *et al.*, 1995 (anteriormente). Pueden humanizarse otros anticuerpos anti-A33 murinos (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento) y pueden emplearse en la modificación por ingeniería genética de agentes de unión multiespecíficos tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se usan ADNc que codifican para regiones variables de cadenas ligeras y/o pesadas de uno o más (normalmente sólo uno) anticuerpo(s) anti-A33 murinos candidatos para construir vectores para la expresión de quimeras murinas-humanas en las que las regiones variables de anticuerpo anti-A33 murino se ligan a regiones constantes de IgG1 humana (para la cadena pesada) y kappa humanas (para la cadena ligera), tal como se describió previamente. Alternativa o adicionalmente, en algunas descripciones, pueden crearse formas novedosas de anticuerpos anti-A33 humanizados con glicosilación variante, por ejemplo, con el fin de potenciar la unión al receptor de Fc y potenciar la afinidad por el antígeno si así se desea.

En algunas descripciones, con el fin de producir anticuerpos anti-A33 humanizados, pueden elegirse dominios de regiones de marcoceptoras humanas mediante concordancia de homología con secuencias de la línea germinal humana. Usando tales regiones de marcoceptoras humanas elegidas, se diseñan los dominios variables de cadena ligera y pesada y pueden generarse y expresarse varias variantes/versiones de cada uno.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Pueden elaborarse anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de visualización de fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos

derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones de solicitud de patente internacionales WO 98/46645, WO 98/60433, WO 98/24893, WO 98/16664, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Las técnicas de Cole *et al.* (1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. R.A. Reisfeld & S. Sell, págs.77-96, Nueva York, Alan R. Liss) y Boerder *et al.* (1991) J. Immunol, 147(1):86-95) también están disponibles para la preparación de anticuerpos humanos monoclonales.

Los anticuerpos humanos producidos usando otras técnicas pero que conservan las regiones variables del anticuerpo anti-A33 de la presente descripción se incluyen en el presente documento. Alternativa o adicionalmente, también pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas de ratón endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, véase Lonberg y Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Taylor, L. D., *et al.*, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. y Green L. L., 2002, Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. *et al.*, 2000, Immunol. Today 21:364-370; Murphy, A.J. *et al.*, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158). Para una descripción detallada de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para la producción de tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacionales WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º 0 598 877; las patentes estadounidenses n.ºs 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.886.793; 5.916.771; 5.939.598; y 8.502.018.

Todavía adicionalmente, pudieron elaborarse anticuerpos monoclonales humanos mediante la inmunización de ratones trasplantados con leucocitos, esplenocitos o médulas óseas de sangre periférica humana (por ejemplo, técnicas Trioma de XTL). Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers *et al.*, 1988, Biotechnol. 12:899-903).

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo anti-A33", una "porción de anticuerpo anti-A33" o un "fragmentos de anticuerpo anti-A33" y/o una "variante de anticuerpo anti-A33", y similares puede, en algunas descripciones, referirse a una entidad que contiene polipéptido que comprende al menos una porción de una inmunoglobulina que se une a A33, y en particular se refiere a una entidad que incluye un polipéptido que al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma (y que contiene normalmente todas las CDR encontradas en una cadena relevante o porción de la misma) encontrada en cualquiera de los anticuerpos monoclonales particulares descritos en el presente documento que con A33. En algunas descripciones, el término se refiere a una entidad que incluye un polipéptido de este tipo que no incluye sólo tales CDR, sino también otras secuencias encontradas en una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de marco, o cualquier porción de las mismas, de origen no murino, preferiblemente de origen humano, que pueden incorporarse en un anticuerpo de la presente descripción. En algunas descripciones particulares, el término "anticuerpo anti-A33", tal como resultará evidente a partir del contexto, se usa para referirse en conjunto o individualmente a huA33, hA33, A33, anticuerpo A33 humanizado, A33 humanizado, y combinaciones de los mismos, y/o fragmentos o componentes relevantes, dominios, o regiones de los mismos, tales como fragmentos variables de cadena sencilla (por ejemplo, scFv huA33, scFv hA33, scFv A33, y combinaciones de los mismos).

En algunas descripciones, un anticuerpo humanizado puede modular, disminuir, antagonizar, mitigar, aliviar, bloquear, inhibir, anular y/o interferir con al menos una función celular *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*, en el que dicha célula expresa A33 humano. Como ejemplo no limitativo, un anticuerpo anti-A33 adecuado, una porción o variante especificada se une con alta afinidad a un epítipo, en particular un epítipo peptídico, de A33 humano.

Pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante técnicas de escisión enzimática, de síntesis o recombinantes, tal como se conoce en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento. También pueden producirse anticuerpos en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpo en los que uno o más codones de terminación se han introducido en el sentido 5' del sitio de terminación natural. Por ejemplo, un gen de combinación que codifica para una porción de cadena pesada F(ab')₂ puede diseñarse para incluir secuencias de ADN que codifican para el dominio C_H1 y/o la región de bisagra de la cadena pesada. Pueden unirse juntas químicamente diversas porciones de anticuerpos mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de modificación por ingeniería genética.

En algunas descripciones, los anticuerpos quiméricos o humanizados incluyen aquellos en los que las CDR se encuentran en uno o más de los anticuerpos anti-A33 descritos en el presente documento y al menos una porción, o el resto del anticuerpo se encuentra en o se deriva de uno o más anticuerpos humanos. Por tanto, por ejemplo, en algunas descripciones, la parte humana del anticuerpo puede incluir las regiones de marco, los dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_H1, C_H2, C_H3), bisagra, V_L, V_H que son sustancialmente no inmunogénicas en seres humanos. Los expertos en la técnica, al leer la presente divulgación, apreciarán que, en algunas descripciones, una "parte humana" de un anticuerpo utilizado tal como se describe en el presente documento, puede, en algunas descripciones, puede no mostrar el 100% de identidad con la correspondiente secuencia encontrada en un anticuerpo humano fuente relevante. En algunas descripciones, se conservan tantos residuos de aminoácidos humanos como sea posible que

se encuentran en el anticuerpo humano fuente con el fin de que la inmunogenicidad sea insignificante, sin embargo, en diversas descripciones, los residuos humanos pueden modificarse según sea necesario o deseado de otro modo para soportar el sitio de unión a antígeno formado por las CDR a la vez que se maximiza simultáneamente la humanización del anticuerpo. Tales cambios o variaciones, en algunas descripciones, conservan o reducen la

5

Los expertos habituales en la técnica, al leer la presente divulgación, apreciarán que un agente de anticuerpo proporcionado por la presente descripción, incluyendo uno que es un anticuerpo humanizado y/o que utiliza elementos de secuencia de un anticuerpo humanizado tal como se describe en el presente documento, puede producirse por una célula de animal no humano o procarionta o eucariota que puede expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente rediseñados (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando el agente de anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, puede comprender un péptido ligador que no se encuentra en anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido ligador, tal como de dos a aproximadamente veinte residuos de glicina u otros aminoácidos, preferiblemente 8-15 residuos de glicina u otros aminoácidos que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Tales péptidos ligadores se considera que son de origen humano.

10

15

Puede realizarse humanización de anticuerpos mediante, por ejemplo, sintetizando una biblioteca combinatoria que comprende las seis CDR de un anticuerpo monoclonal diana no humano fusionado en marco con una agrupación de regiones de marco humanas individuales. Puede utilizarse una biblioteca de región de marco humana que contiene genes representativos de todos los genes conocidos de la línea germinal humana de cadena pesada y ligera. Las bibliotecas combinatorias resultantes pueden examinarse para determinar la unión a antígenos de interés. Un enfoque de este tipo puede permitir un examen y/o una selección de combinaciones particularmente favorables (por ejemplo, en cuanto a mantener la actividad de unión al anticuerpo parenteral) de regiones de marco completamente humanas. Los anticuerpos humanizados pueden optimizarse entonces mediante una variedad de técnicas.

20

Puede usarse humanización de anticuerpos para evolucionar anticuerpos de ratón u otros anticuerpos no humanos en anticuerpos "completamente humanos". El/los anticuerpo(s) resultante(s) puede(n) contener sólo secuencia humana y ninguna secuencia de anticuerpo de ratón o de anticuerpo no humano, mientras que se mantienen una afinidad y especificidad similares que las del anticuerpo de partida.

25

En algunas descripciones, los anticuerpos anti-A33 humanizados comprenden una región Fc variante, en los que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc silvestre (o la región Fc parental), de modo que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un receptor de Fc (por ejemplo, un Fc γ R), siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en posiciones que hagan un contacto directo con el receptor de Fc basándose en el análisis cristalográfico y estructural de interacciones de receptor de Fc-Fc tales como las dadas a conocer por Sondermann *et al.* (2000, Nature, 406:267-273). Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen un contacto directo con un receptor de Fc tal como un Fc γ R son los aminoácidos 234-239 (región de bisagra), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 bucle (F/G). En algunas descripciones, los anticuerpos anti-A33 de la presente descripción que comprenden regiones Fc variantes comprenden la modificación de al menos un residuo que hace un contacto directo con un Fc γ R basándose en el análisis estructural y cristalográfico.

30

35

En algunas descripciones, un anticuerpo anti-A33 es un anticuerpo A33 humanizado con una afinidad alterada por receptores de activación y/o inhibidores, que tiene regiones Fc variantes con una o más modificaciones de aminoácido, en el que dicha una o más modificación de aminoácido es una sustitución en la posición 297 por alanina; en algunas descripciones, una sustitución en 239D, 330L, 332E para potenciar la afinidad por FcR; en algunas descripciones, una sustitución en 322K para reducir o eliminar la unión a FcR. En algunas descripciones, los anticuerpos anti-A33 tienen una región Fc con glicosilación variante en comparación con una región Fc parental; en algunas descripciones, la glicosilación variante incluye ausencia de fucosa; en algunas descripciones, la glicosilación variante resulta de la expresión en células CHO deficientes en GnT1. En algunas descripciones, se proporcionan agentes de unión biespecíficos que tienen un componente del anticuerpo humanizado A33 que comprende una región Fc variante caracterizada por una sustitución K322A. En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico proporcionado incluye un componente de anticuerpo que muestra glicosilación variante (por ejemplo, está aglicosilado) en comparación con un anticuerpo parental del que puede derivarse el componente; en algunas de tales descripciones, una variante de este tipo puede ser o comprender una región Fc variante caracterizada por la sustitución K322A. En algunas descripciones, tales componentes variantes (por ejemplo, regiones Fc variantes) dan como resultado una eliminación completa de la activación del complemento y la unión a FcR, que de otro modo podría dañar la membrana de la célula tumoral antes de la adición de un agente de aclaramiento en radioinmunoterapia dirigida previamente tal como se describe en el presente documento.

45

50

55

La presente descripción también proporciona y/o utiliza anticuerpos o agentes de anticuerpo que comprenden una región Fc variante (es decir, una región Fc incluye una o más adiciones, deleciones y/o sustituciones con respecto a un Fc de referencia apropiado) que se caracteriza en que su alterar función efectora alterada y/o su afinidad por un FcR se potencia o disminuye con respecto al Fc de referencia. Estas variaciones están dentro de la habilidad de un experto en la técnica.

60

Por tanto, entre otras cosas, la presente descripción proporciona agentes de unión multiespecíficos (por ejemplo, agentes de anticuerpo) que comprenden regiones Fc variantes que se unen con una mayor afinidad a uno o más Fc γ R. Tales agentes median preferiblemente una función efectora más eficazmente tal como se comenta a continuación. También se describen agentes de unión multiespecíficos (por ejemplo, agentes de anticuerpo) que comprenden una región Fc variante que se unen con una afinidad más débil a uno o más Fc γ R. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en determinados casos, por ejemplo, en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica el bloqueo o antagonismo pero no la destrucción de las células que portan un antígeno diana. Además, la eliminación de la función efectora es deseable, en algunas descripciones, cuando se elaboran anticuerpos biespecíficos tal como se comenta a continuación. La reducción o eliminación de la función efectora sería deseable en casos de enfermedad autoinmunitaria en los que se bloquearían receptores de activación de Fc γ R en células efectoras (este tipo de función estaría presente en las células huésped). Generalmente, una función efectora aumentada puede dirigirse a células tumorales o foráneas; en algunas descripciones, la función efectora puede dirigirse fuera de las células tumorales.

Pueden combinarse variantes de Fc con otras modificaciones de Fc, incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones que alteran la función efectora. La descripción abarca la combinación de una variante de Fc tal como se describe en el presente documento con otras modificaciones de Fc para proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o novedosas en anticuerpos o fusiones de Fc. En algunas de tales descripciones, las variantes de Fc pueden potenciar el fenotipo de la modificación con la que se combinan. Por ejemplo, si una variante de Fc se combina con un mutante conocido para unirse a Fc γ R11A con una mayor afinidad que una molécula comparable que comprende una región Fc silvestre, la combinación con el mutante da como resultado un mayor potenciamiento en veces de la afinidad por Fc γ R11A.

En algunas descripciones, se incorporan variantes de Fc tal como se describe en el presente documento en un anticuerpo o una fusión de Fc para generar un agente modificado por ingeniería genética que comprende una o más glicofomas de Fc (es decir, uno o más polipéptidos de Fc a los que se une de manera covalente uno o más hidratos de carbono) con respecto a una molécula que comprende una región Fc en la que la composición de hidratos de carbono de la glicofoma difiere químicamente de la de una molécula parental que comprende una región Fc.

En algunas descripciones, un agente de unión multiespecífico (por ejemplo, un agente de anticuerpo) tal como se describe en el presente documento puede incluir una variante de Fc que muestra glicosilación variante y/o puede expresarse en una línea celular deficiente en glicosilación (por ejemplo, una célula CHO deficiente en GnT1), una región Fc de este tipo del agente se produce carente de glicosilación en comparación con una región Fc de referencia apropiada (por ejemplo, una silvestre), o una región Fc expresada en una línea celular que no es deficiente en glicosilación.

En algunas descripciones, los anticuerpos pueden tener un sitio de glicosilación modificado con respecto a un anticuerpo de referencia apropiado que se une a un antígeno de interés (por ejemplo, A33), preferiblemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión a antígeno. Tal como se usa en el presente documento, los "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo al que se unirá de manera específica y covalente un oligosacárido (es decir, hidratos de carbono que contienen dos o más azúcares simples unidos juntos). Las cadenas laterales de oligosacáridos se ligan normalmente a la estructura principal de un anticuerpo por medio de uniones o bien por el N o bien por el O. La glicosilación unida por el N se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación unida por el O se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Por ejemplo, una glicofoma de Fc (huA33-IgG1n) que carece de determinados oligosacáridos incluyendo fucosa y N-acetilglucosamina terminal puede producirse en células CHO especiales y presentar función efectora de ADCC potenciada.

Se describen métodos de modificación del contenido de hidratos de carbono de un anticuerpo mediante la adición o delección de un sitio de glicosilación. En la técnica se conocen bien métodos para modificar el contenido de hidratos de carbono de anticuerpos, véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.218.149; el documento EP0359096B1; la publicación de patente estadounidense n.º US 2002/0028486; la publicación de solicitud de patente internacional WO 03/035835; la publicación de patente estadounidense n.º 2003/0115614; la patente estadounidense n.º 6.218.149; la patente estadounidense n.º 6.472.511. También se describen métodos de modificación del contenido de hidratos de carbono de un anticuerpo (o una porción o un componente relevante del mismo) mediante la delección de uno o más restos de hidratos de carbono endógenos del anticuerpo. La presente descripción también puede incluir la delección del sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, mediante la modificación de la posición 297 de asparagina por alanina.

Las glicofomas modificadas por ingeniería genética pueden ser útiles para una variedad de fines incluyendo, pero sin limitarse a, potenciar o reducir la función efectora. Las glicofomas modificadas por ingeniería genética pueden generarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de cepas de expresión variantes o modificadas por ingeniería genética, mediante la expresión conjunta con una o más enzimas, por ejemplo DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), mediante la expresión de una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o mediante la modificación de hidrato(s) de carbono después de que se haya expresado la molécula que comprende la región Fc.

En la técnica se conocen métodos para generar glicofomas modificadas por ingeniería genética e incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Umana *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294; Shields *et al.*, 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473; la patente estadounidense n.º 6.602.684; la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/277.370; la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/113.929; las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 00/61739A1; WO 01/292246A1; WO 02/311140A1; WO 02/30954A1; tecnología POTILLEGENT™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnología de modificación por ingeniería genética de glicosilación GLYCOMAB™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza). Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO 00/061739; el documento EA01229125; la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0115614; Okazaki *et al.*, 2004, JMB, 336:1239-49.

Agentes de unión multivalentes

Tal como saben los expertos en la técnica, un agente de unión multivalente es una entidad o un complejo molecular que incluye componentes de unión que se unen específicamente a dos o más dianas (por ejemplo, epítopos). Tales agentes de unión multivalentes encuentran una variedad de usos en la técnica, incluyendo usos terapéuticos. Para dar un ejemplo, tal como saben los expertos en la técnica, los agentes de unión multivalentes se han modificado por ingeniería genética para facilitar la destrucción de células tumorales mediante el direccionamiento (o reclutamiento) de células T citotóxicas a un sitio tumoral. Los ejemplos de antígenos tumorales incluyen, pero no se limitan a, alfa-fetoproteína (AFP), CA15-3, CA27-29, CA19-9, CA-125, calretinina, antígeno carcinoembrionario, CD34, CD99, CD117, cromogranina, citoqueratina, desmina, proteína de membrana epitelial (EMA), factor VIII, CD31 FL1, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína del líquido de la enfermedad quística macroscópica (GCDFP-15), HMB-45, gonadotropina coriónica humana (hCG), inhibina, queratina, CD45, un marcador linfocitario, MART-1 (Melan-A), Myo D1, actina específica de músculo (MSA), neurofilamento, enolasa específica de neurona (NSE), fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), antígeno específico de próstata, proteína S100, actina de músculo liso (AME), sinaptofisina, tiroglobulina, factor-1 de transcripción tiroidea, tumor M2-PK y vimentina.

En algunas descripciones, los agentes de unión multivalentes son agentes de unión biespecíficos. En muchas descripciones, tales agentes de unión biespecíficos pueden unirse a células tumorales. En muchas descripciones, tales agentes de unión biespecíficos pueden unirse a células de cáncer colorrectal humano por medio de un antígeno A33 expresado en la superficie de la célula tumoral.

En algunas descripciones, los agentes de unión multivalentes (por ejemplo, agentes de unión biespecíficos) proporcionados por la presente descripción son o comprenden componentes de anticuerpo. En la técnica se conocen una variedad de tecnologías para diseñar, construir y/o producir agentes de unión multiespecíficos que comprenden componentes de anticuerpo.

Por ejemplo, se han construido agentes de unión multivalentes que o bien utilizan toda la región de marco de inmunoglobulina completa (por ejemplo, IgG), un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), o bien combinaciones de los mismos. Se ha demostrado que los agentes de unión biespecíficos compuestos por dos unidades de scFv en tándem son un formato de anticuerpo biespecífico clínicamente satisfactorio. En el caso de la inmunoterapia antitumoral, se han diseñado agentes de unión biespecíficos que comprenden dos fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) en tándem de modo que un scFv que se une a un antígeno tumoral se liga con un scFv que entra en contacto con células T mediante la unión a CD3. De esta manera, se reclutan células T a un sitio tumoral con la esperanza de que puedan mediar en la destrucción de las células tumorales que constituyen el tumor por las propiedades citotóxicas que tienen determinadas células T. Se ha realizado un ejemplo de un agente de unión biespecífico de este tipo que selecciona como diana CD19 y CD3 para linfoma (denominado contacto con células T biespecífico, o BiTE; por ejemplo, véase Dreier *et al.*, 2003, J. Immunol. 170:4397-4402; Bargou *et al.*, 2008, Science 321:974-977), que ha sido satisfactorio en la prevención del crecimiento tumoral en estudios de xenoinjerto en animales. En estudios con seres humanos, este agente de unión biespecífico demostró una respuesta tumoral objetivo, que incluía cinco remisiones parciales y dos completas.

Los agentes de unión biespecíficos a modo de ejemplo incluyen aquellos con un primer componente de anticuerpo específico para un antígeno tumoral y un segundo componente de anticuerpo específico para un hapteno de molécula pequeña (por ejemplo, DTPA, IMP288, DOTA, DOTA-Bn, DOTA-desferrioxamina, biotina, fluoresceína, o aquellos dados a conocer en Goodwin, D.A. *et al.*, 1994, Cancer Res. 54(22):5937-5946). Pueden elaborarse agentes de unión biespecíficos, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras que reconocen epítopos diferentes del mismo antígeno o diferente. En algunas descripciones, mediante función molecular, un agente de unión biespecífico se une a un antígeno (o epítipo) en uno de sus dos brazos de unión (un par V_H/V_L), y se une a un antígeno diferente (o epítipo) en su segundo brazo (un par V_H/V_L diferente). Mediante esta definición, un agente de unión biespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos (tanto en especificidad como en secuencias de CDR), y es monovalente para cada antígeno al que se une.

En algunas descripciones, los agentes de unión biespecíficos se caracterizan por la capacidad de unirse simultáneamente a dos dianas que son de estructura diferente. En algunas descripciones, los agentes de unión biespecíficos tienen al menos un componente que se une específicamente a, por ejemplo, un antígeno o epítipo de célula B, célula T, mielóide, plasma o mastocito y al menos otro componente que se une específicamente a un

conjugado dirigible que porta un agente terapéutico o de diagnóstico.

Los agentes de unión biespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) de la presente descripción se basan en la percepción particular de que determinados formatos pueden ser más beneficiosos para determinadas dianas (por ejemplo, un antígeno tumoral) cuando se emplean en la metodología de radioinmunoterapia dirigida previamente (PRIT) de múltiples etapas que selecciona como diana el antígeno A33 humano. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos proporcionados en el presente documento utilizan una combinación de una IgG completa y un scFv. Tales anticuerpos biespecíficos demuestran unión bivalente por medio del componente de IgG (por ejemplo, anti-A33) y unión bivalente por medio del componente de scFv (por ejemplo, anti-DOTA-Bn). Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos biespecíficos que tienen este formato se unen en primer lugar a una célula tumoral positiva para A33 por medio del componente de IgG (por ejemplo, anti-A33) y el anticuerpo en exceso se somete a aclaramiento de la sangre por medio de un agente de aclaramiento (CA; por ejemplo, un agente de aclaramiento a base de dextrano). Esto se sigue de una etapa que incluye el uso de un hapteno de molécula pequeña radiomarcada (por ejemplo, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn). Las moléculas pequeñas radiomarcadas a modo de ejemplo incluyen lantánidos radiomarcados, por ejemplo, itrio y lutecio (por ejemplo, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y y ¹⁷⁷Lu) así como ¹²⁴I e ¹³¹I. Además, los anticuerpos biespecíficos de la presente descripción proporcionan características de direccionamiento tumoral tanto de diagnóstico como terapéuticas.

En diversas descripciones, un agente de unión biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) se compone de a primer componente de unión y un segundo componente de unión. En muchas descripciones, los componentes de unión primero y segundo de un agente de unión biespecífico tal como se describe en el presente documento se componen cada uno de componentes de anticuerpo caracterizados por especificidades diferentes. En muchas descripciones, los componentes de anticuerpo se seleccionan de la tabla 8.

En diversas descripciones, un agente de unión biespecífico comprende un primer componente de unión, un segundo componente de unión. En diversas descripciones, un agente de unión biespecífico comprende un primer componente de unión, un segundo componente de unión y un ligador que se conecta tanto al primer como al segundo componente de unión (por ejemplo, posicionado entre los componentes de unión primero y segundo).

En diversas descripciones, los componentes de unión primero y/o segundo tal como se describe en el presente documento comprenden o son componentes de anticuerpo. En diversas descripciones, los componentes de unión primero y/o segundo tal como se describe en el presente documento comprenden una secuencia de ligador.

En algunas descripciones, un ligador es de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos de longitud. En algunas descripciones, un ligador se caracteriza porque tiende a no adoptar una estructura tridimensional rígida, sino que proporciona flexibilidad al polipéptido (por ejemplo, componentes de unión primero y/o segundo). En algunas descripciones, un ligador se emplea en un agente de unión biespecífico descrito en el presente documento basándose en las propiedades específicas conferidas al agente de unión biespecífico tales como, por ejemplo, una reducción de la agregación y/o un aumento de la estabilidad. En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico comprende un ligador G₄S. En algunas descripciones determinadas, un agente de unión biespecífico comprende un ligador (G₄S)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más.

En diversas descripciones, los componentes de unión primero y/o segundo tal como se describen en el presente documento comprenden o son inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG). En diversas descripciones, los componentes de unión de componentes de unión primero y/o segundo tal como se describe en el presente documento comprenden o son fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, scFv). En diversas descripciones, los primeros componentes de unión tal como se describe en el presente documento comprenden o son inmunoglobulinas y los segundos componentes de unión comprenden o son fragmentos de anticuerpo. En algunas descripciones determinadas, los primeros componentes de unión son inmunoglobulinas y los segundos componentes de unión son fragmentos de anticuerpo. En algunas descripciones determinadas, los primeros componentes de unión son IgG y los segundos componentes de unión son scFv.

En algunas descripciones determinadas, un agente de unión biespecífico comprende una inmunoglobulina, inmunoglobulina que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y un scFv. En algunas descripciones determinadas, los scFv se ligan al extremo C-terminal de la cadena pesada de la inmunoglobulina. En algunas descripciones determinadas, los scFv se ligan al extremo C-terminal de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En diversas descripciones, los scFv se ligan a cadenas pesadas o ligeras a través de una secuencia de ligador.

En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico comprende una o más secuencias que son al menos aproximadamente el 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%) idénticas a una o más secuencias que aparecen en la tabla 8.

En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico comprende una o más secuencias que son sustancialmente idénticas a una o más secuencias que aparecen en la tabla 8.

En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico comprende una o más secuencias que son idénticas a

una o más secuencias que aparecen en la tabla 8.

En algunas descripciones, un agente de unión biespecífico se selecciona de una o más secuencias que aparecen en la tabla 8. En algunas descripciones determinadas, un agente de unión biespecífico se selecciona de dos secuencias que aparecen en la tabla 8, por ejemplo, una secuencia de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera.

5 En diversas descripciones, un primer componente de unión de un agente de unión biespecífico tal como se describe en el presente documento comprende un componente de anticuerpo que tiene una secuencia al menos el 50% (por ejemplo, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más) idéntica a un componente de anticuerpo que aparece en la tabla 8.

10 En diversas descripciones, un primer componente de unión de un agente de unión biespecífico tal como se describe en el presente documento comprende un componente de anticuerpo que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a un componente de anticuerpo que aparece en la tabla 8.

En diversas descripciones, un primer componente de unión de un agente de unión biespecífico tal como se describe en el presente documento comprende un componente de anticuerpo que tiene una secuencia que es idéntica a un componente de anticuerpo que aparece en la tabla 8.

15 En diversas descripciones, un segundo componente de unión de un agente de unión biespecífico tal como se describe en el presente documento comprende un componente de anticuerpo que tiene una secuencia al menos el 50% (por ejemplo, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más) idéntica a un componente de anticuerpo que aparece en la tabla 8.

20 En diversas descripciones, un segundo componente de unión de un agente de unión biespecífico tal como se describe en el presente documento comprende un componente de anticuerpo que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica a un componente de anticuerpo que aparece en la tabla 8.

25 En diversas descripciones, un segundo componente de unión de un agente de unión biespecífico tal como se describe en el presente documento comprende un componente de anticuerpo que tiene una secuencia que es idéntica a un componente de anticuerpo que aparece en la tabla 8.

Tal como se describe en el presente documento, los presentes inventores proporcionan un método de PRIT de múltiples etapas mejorado en ratones inmunodeprimidos que portan tumores colorrectales humanos positivos para A33 s.c. (SW1222) usando un anticuerpo biespecífico denominado huA33-C825. Tal metodología incluye la inyección i.v. de diversas dosis de huA33-C825 y un CA a base de dextrano, seguido de inyección de hapteno de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn teranóstico (es decir, de diagnóstico y terapéutico) para la obtención de imágenes gammagráficas y radioinmunoterapia simultáneas. Se describen específicamente estudios de biodistribución que proporcionan dosis óptimas de huA33-C825 y CA, seguido de una serie de estudios de biodistribución adicionales para determinar la captación tumoral en función de las dosis de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (~2,0-111,0 MBq) para servir como guía práctica y dosimétrica para los estudios de PRIT. Además, tal como se describe en el presente documento, se extirparon los tumores y riñones a las 24 horas tras la inyección de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn a tres niveles de dosis diferentes (11,1, 55,0 y 111,0 MBq) para examinar *ex vivo* la microdistribución de la actividad de ¹⁷⁷Lu mediante autorradiografía, así como correlacionar la actividad de ¹⁷⁷Lu con la morfología de xenoinjerto y tejido mediante tinción con hematoxilina y eosina. Además, la captación absoluta estimada de tumores SW1222 de huA33-C825 24 h p.i. de 0,25 mg/ratón basándose en los estudios con trazadores radiactivos con ¹³¹I-huA33-C825 fue de ~90 pmol/g de tumor. Por tanto, la presente descripción demuestra que si una sola molécula de huA33-C825 tiene la capacidad de unirse a dos moléculas de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (por tanto, capacidad de unión máxima de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn de 180 pmol/g de tumor), el grado de ocupación máximo estimado es de (11 pmol de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn/180 pmol = 0,061 o ~6%). Por tanto, la presente descripción demuestra específicamente que el método de PRIT mejorado fue eficaz sin ninguna respuesta a la radiación adversa asociada. Además, la presente descripción demuestra específicamente que, al menos en algunas descripciones, los ratones inmunodeprimidos con xenoinjertos colorrectales humanos s.c. establecidos podrían curarse con una toxicidad mínima para los tejidos normales incluyendo médula ósea y riñón usando un método de PRIT de múltiples etapas mejorado que emplea un anticuerpo biespecífico anti-A33/anti-DOTA-Bn (metal) denominado huA33-C825, un CA a base de dextrano y ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn.

50 SW1222 destaca entre los carcinomas colorrectales humanos investigados habitualmente (por ejemplo, LS174T) como un tumor relativamente bien diferenciado y vascularizado. Aunque permite una distribución homogénea de anticuerpos dirigidos (Emir *et al.*, 2007, Cancer Res. 15;67(24):11896-11905), estos tumores también son relativamente resistentes a la radioterapia. Tal como se describe en el presente documento, el antígeno A33 se expresa altamente en más del 95% de cánceres de colon humano con expresión normal limitada y excreción mínima en la circulación. No ha habido un direccionamiento terapéutico clínico exitoso del antígeno A33 en cáncer colorrectal humano. Los anticuerpos biespecíficos tal como se describen en el presente documento demuestran afinidad por A33 y un DOTA-Bn (metal), que facilita la captación tumoral de lutecio radiomarcado (por ejemplo, ¹⁷⁷Lu) y la administración exitosa de radioinmunoterapia dirigida en tumores positivos para A33. Además, las proteínas de unión biespecíficas que emplean anticuerpos A33 humanizados tal como se describe en el presente documento son

capaces de la unión bivalente a A33 y la unión bivalente a DOTA-Bn, lo que da como resultado una potencia mejorada para la destrucción de tumores positivos para A33 y una seguridad aumentada de una falta de respuesta a la radiación catastrófica. Así, la estrategia de PRIT que emplea el formato de las proteínas de unión biespecíficas tal como se describe en el presente documento representa un enfoque único para la destrucción tumoral mejorada, efectos adversos reducidos y demuestra ser un agente terapéutico potente para el tratamiento de varios cánceres positivos para A33.

Dianas

Entre otras cosas, la presente descripción reconoce que agentes de unión multiespecíficos, y particularmente agentes de unión biespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, son particularmente útiles y/o eficaces para facilitar la destrucción de células. En particular, la presente descripción demuestra que la actividad de agentes de unión multivalentes que se unen específicamente tanto a un epítipo asociado a células diana (por ejemplo, un antígeno tumoral) como a un hapteno de molécula pequeña (por ejemplo, un DOTA-Bn [metal]) puede ser una inmunoterapia eficaz para cánceres de colon.

Por ejemplo, en algunas descripciones, un agente de unión multivalente se une específicamente a un epítipo asociado a células tumorales y un hapteno de molécula pequeña. Según tales descripciones, el agente de unión multivalente puede facilitar la unión del agente a uno o ambos de sus epítopos diana y/o puede potenciar la destrucción de la célula tumoral diana tal como se media mediante radioinmunoterapia por medio del hapteno de molécula pequeña.

En algunas descripciones, las células diana que van a destruirse incluyen, por ejemplo, células que expresan un antígeno tumoral (por ejemplo, un tumor positivo para A33). Los expertos habituales en la técnica serán conscientes de los epítopos diana apropiados en tales células a los que se unen de manera deseable los agentes de unión multivalentes tal como se describe en el presente documento.

Construcción y expresión de ácidos nucleicos

Los anticuerpos humanizados y agentes de unión multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) tal como se describe en el presente documento pueden producirse a partir de moléculas de ácido nucleico usando métodos de biología molecular conocidos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico se insertan en un vector que puede expresar las proteínas de fusión cuando se introduce en una célula huésped apropiada. Las células huésped apropiadas incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, de levadura, de insecto y de mamífero. Cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector puede usarse para construir vectores de expresión que codifican para las proteínas de fusión de la presente descripción bajo control de señales de control transcripcional/traduccionales. Estos métodos pueden incluir técnicas de síntesis y de ADN recombinante *in vitro* y de recombinación *in vivo* (Véase, Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

La expresión de moléculas de ácido nucleico según la presente descripción puede regularse por una segunda secuencia de ácido nucleico de manera que la molécula se expresa en un huésped transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la descripción puede controlarse por un elemento promotor y/o potenciador que se conocen en la técnica.

Los constructos de ácido nucleico incluyen regiones que codifican para las proteínas de unión multiespecíficas generadas a partir de anticuerpos y/o componentes de anticuerpo. Normalmente, tales proteínas de unión multiespecíficas se generarán a partir de regiones V_H y/o V_L . Después de la identificación y selección de anticuerpos que presentan las propiedades de unión y/o funcionales deseadas, se aíslan, amplifican, clonan y secuencian las regiones variables de cada anticuerpo. Las modificaciones pueden realizarse en las secuencias de nucleótidos de V_H y V_L , incluyendo adiciones de secuencias de nucleótidos que codifican para aminoácidos y/o que portan sitios de restricción, deleciones de secuencias de nucleótidos que codifican para aminoácidos, o sustituciones de secuencias de nucleótidos que codifican para aminoácidos. Los anticuerpos y/o componentes de anticuerpo pueden generarse a partir de anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos.

Los constructos de ácido nucleico de la presente descripción se insertan en un vector de expresión o vector viral mediante métodos conocidos en la técnica, y las moléculas de ácido nucleico se unen de manera operativa a una secuencia de control de la expresión.

Cuando sea apropiado, las secuencias de ácido nucleico que codifican para anticuerpos humanizados y agentes de unión multiespecíficos tal como se describe en el presente documento pueden modificarse para incluir codones que se optimizan para la expresión en un tipo de célula u organismo particular (por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 5.670.356 y la patente estadounidense n.º 5.874.304). Las secuencias optimizadas por codón son secuencias sintéticas, y codifican preferiblemente para el polipéptido idéntico (o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de longitud completa que tiene sustancialmente la misma actividad que el polipéptido de longitud completa) codificado por el polinucleótido parental no optimizado por codón. En algunas descripciones, la región codificante del material genético que codifica para componentes de anticuerpo, por completo o en parte,

5 puede incluir una secuencia alterada para optimizar el uso de codones para un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula eucariota o procariota). Por ejemplo, la secuencia codificante para una región variable de cadena pesada (o ligera) humanizada tal como se describe en el presente documento puede optimizarse para la expresión en una células bacterianas. Alternativamente, la secuencia codificante puede optimizarse para la expresión en una célula de mamífero (por ejemplo, una CHO). Una secuencia de este tipo puede describirse como una secuencia optimizada por codón.

10 Un vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico se transforma en una célula huésped adecuada para permitir la producción de la proteína codificada por los constructos de ácido nucleico. Las células huésped a modo de ejemplo incluyen procariotas (por ejemplo, *E. coli*) y eucariotas (por ejemplo, una célula COS o CHO). Las células huésped transformadas con un vector de expresión se hacen crecer en condiciones que permitan la producción de un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico de la presente descripción seguido de la recuperación del anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico.

15 Los anticuerpos humanizados y/o agentes de unión multiespecíficos de la presente descripción pueden purificarse mediante cualquier técnica que permita la formación posterior de una molécula de agente de unión o un anticuerpo estable. Por ejemplo, sin desear limitarse a la teoría, pueden recuperarse anticuerpos y/o agentes de unión multiespecíficos de células o bien como polipéptidos solubles o como cuerpos de inclusión, a partir de los cuales pueden extraerse de manera cuantitativa mediante clorhidrato de guanidinio 8 M y diálisis. Con el fin de purificar adicionalmente los anticuerpos y/o agentes de unión multiespecíficos de la presente descripción, pueden usarse cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa o 20 filtración en gel convencionales. Los anticuerpos humanizados y/o agentes de unión multiespecíficos de la presente descripción también pueden recuperarse de medios acondicionados seguido de secreción de células eucariotas o procariotas.

Métodos de examen y detección

25 Los anticuerpos humanizados y/o agentes de unión multiespecíficos de la presente descripción también pueden usarse en métodos de examen *in vitro* o *in vivo* en los que es deseable detectar y/o medir una o más actividades de una célula o células (por ejemplo, apoptosis o crecimiento celular). Los métodos de examen se conocen bien en la técnica e incluyen ensayos libres de células, basados en células y ensayos en animales. Los ensayos *in vitro* pueden ser o bien en estado sólido o bien puede lograrse la detección de moléculas diana solubles de varias maneras conocidas en la técnica, incluyendo el uso de una etiqueta o un grupo detectable que puede identificar un anticuerpo humanizado o un agente de unión multiespecífico que se une a una molécula diana (por ejemplo, 30 antígeno de la superficie celular). Las etiquetas detectables pueden usarse junto con ensayos que usan anticuerpos humanizados o agentes de unión multiespecíficos de la presente descripción.

Agentes terapéuticos

35 Los anticuerpos humanizados y/o agentes de unión multivalentes de la presente descripción pueden utilizarse como agentes terapéuticos. En algunas descripciones, como se entenderá en la técnica, se utilizan sin modificación adicional. En algunas descripciones, pueden incorporarse en una composición o formulación tal como se describe en el presente documento. En algunas descripciones, pueden asociarse o unirse químicamente (por ejemplo, conjugarse) con uno o más de otros agentes o entidades, por ejemplo, con una carga útil.

40 Se conocen bien en la técnica una variedad de tecnologías para la conjugación de agentes de anticuerpo, o componentes de los mismos, con otros restos o entidades y pueden utilizarse según la práctica de la presente descripción. Para dar un ejemplo, pueden producirse agentes de anticuerpo marcados radiactivamente según tecnologías bien conocidas en la técnica.

45 Por ejemplo, pueden yodarse anticuerpos monoclonales mediante el contacto con yoduro de sodio y/o potasio y un agente de oxidación química tal como hipoclorito de sodio, o un agente de oxidación enzimática, tal como lactoperoxidasa. Los agentes de anticuerpo pueden marcarse con tecnecio-99m mediante un procedimiento de intercambio de ligandos, por ejemplo, reduciendo pertecnato con disolución de estaño, sometiendo a quelación el tecnecio reducido en una columna Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna. En algunas descripciones, los agentes de anticuerpo proporcionados se marcan usando técnicas de marcado directo, por ejemplo, mediante la incubación de pertecnato, un agente reductor tal como SNCl_2 , una disolución tampón tal como disolución de ftalato 50 de sodio-potasio y el anticuerpo. Los grupos funcionales intermediarios que se usan a menudo para unir radioisótopos que existen como iones metálicos al anticuerpo son ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), o ácido etilendiaminotetracético (EDTA), o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), o p-aminobencil-DOTA (DOTA-Bn). Los isótopos radiactivos pueden detectarse, por ejemplo, mediante dosimetría.

Métodos terapéuticos

55 La capacidad de los anticuerpos humanizados y/o agentes de unión multiespecíficos de la presente descripción de presentar alta unión por afinidad por uno de los antígenos diana los hace terapéuticamente útiles para seleccionar como diana de manera eficaz células que expresan el antígeno diana. Por tanto, algunas descripciones, puede ser deseable aumentar la afinidad de un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico por un antígeno

diana y no por el otro antígeno diana que también se une por el agente de unión multiespecífico (o un receptor de Fc en el caso de un anticuerpo humanizado). Por ejemplo, en el contexto de la destrucción tumoral, determinadas condiciones pueden beneficiarse de un aumento o una disminución en la afinidad por un antígeno tumoral pero no por un segundo antígeno. Por tanto, puede ser beneficioso aumentar la afinidad de unión de un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico por un antígeno tumoral en un paciente que tiene un tumor que expresa el antígeno tumoral a través del uso de un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico tal como se describe en el presente documento.

La presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado y/o agente de unión multiespecífico tal como se describe en el presente documento como un agente terapéutico para el tratamiento de pacientes que tienen un tumor que expresa un antígeno que puede unirse por un agente de unión multiespecífico de este tipo. Tales anticuerpos humanizados y/o agentes de unión multiespecíficos pueden usarse en un método de tratamiento del cuerpo de seres humanos o animales, o en un método de diagnóstico.

Administración

La presente descripción proporciona métodos de administración de una cantidad eficaz de un principio activo terapéutico descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico) a un sujeto que necesita el tratamiento.

Los anticuerpos humanizados o agentes de unión multiespecíficos tal como se describe en el presente documento pueden administrarse a través de diversos métodos conocidos en la técnica para la administración terapéutica de agentes, tales como proteínas, o pueden usarse ácidos nucleicos para la administración terapéutica de un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico o ácido nucleico que codifica para un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico de la presente descripción para destruir o inhibir el crecimiento de células diana en un sujeto, por ejemplo, transfección celular, terapia génica, administración directa con un vehículo de administración o portador farmacéuticamente aceptable, administración indirecta proporcionando células recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica para un agente de unión multiespecífico de la presente descripción .

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico de la presente descripción, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Las vías de administración pueden ser entérica o parenteral e incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, transdérmica o transmucosa (por ejemplo, oral o nasal). En algunas descripciones, los agentes de unión multiespecíficos se administran por vía intravenosa. En algunas descripciones, los agentes de unión multiespecíficos se administran por vía subcutánea. En algunas descripciones, los agentes de unión multiespecíficos se administran junto con otros agentes biológicamente activos.

Los expertos habituales en la técnica, al leer la presente divulgación, apreciarán fácilmente que la terapia con un principio activo terapéutico descrito en el presente documento (por ejemplo, con un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico), tal como se describe en el presente documento, puede, en determinadas descripciones, combinarse con otras terapias, y particularmente incluyendo otras terapias antitumorales. En algunas descripciones, tales otras terapias antitumorales pueden ser o comprender, por ejemplo, la administración de uno o más agentes quimioterápicos, agentes inmunomoduladores, radioterapia, terapia con ultrasonidos de alta frecuencia, cirugía, etc.

En algunas descripciones, puede seleccionarse la programación relativa de la administración de un principio activo terapéutico descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico) y otra terapia con la que se combina para optimizar el efecto.

Para dar algunos ejemplos, en algunas descripciones, un principio activo terapéutico tal como se describe en el presente documento se administra en condiciones y durante un periodo de tiempo (por ejemplo, según una pauta posológica) suficientes para que sature las células tumorales. En algunas descripciones, el principio activo terapéutico no unido se retira del torrente circulatorio después de la administración; en algunas de tales descripciones, tal aclaramiento se produce (por ejemplo, se permite que se produzca) antes de la administración de otro agente.

En algunas descripciones particulares, un principio activo terapéutico tal como se describe en el presente documento se administra en combinación con otro agente que selecciona como diana DOTA-Bn. En algunas de tales descripciones, el otro agente porta una carga útil. En algunas descripciones, la carga útil puede ser o comprender una carga útil de agente terapéutico (por ejemplo, una carga útil tóxica). En algunas descripciones, la carga útil puede ser o comprender una carga útil de agente de detección.

En algunas descripciones particulares, un principio activo terapéutico descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico) tal como se describe en el presente documento se administra de manera que se saturan las células tumorales, y posteriormente se administra un

segundo agente que selecciona como diana DOTA-Bn (y puede portar una carga útil). Opcionalmente, se administra al menos un tercer agente que selecciona como diana DOTA-Bn (por ejemplo, y puede portar una carga útil diferente).

5 En algunas descripciones, se administran los agentes segundo y, opcionalmente, tercero un periodo de tiempo después de la administración de un principio activo terapéutico descrito en el presente documento, cuyo periodo de tiempo puede ser suficiente para permitir el aclaramiento de agente terapéutico no unido. En algunas descripciones, se administran los agentes segundo y, opcionalmente, tercero sin la administración adicional del agente terapéutico. Por ejemplo, en algunas descripciones, un principio activo terapéutico tal como se describe en el presente documento se administra según un régimen que incluye al menos un ciclo de: (i) administración del agente terapéutico (opcionalmente, de manera que se saturan las células tumorales relevantes); (ii) administración de un segundo y, opcionalmente, al menos un tercer agente (por ejemplo, que selecciona como diana DOTA-Bn, y puede portar opcionalmente una carga útil); (iii) administración adicional opcional de los agentes segundo y/o tercero, sin administración adicional del agente terapéutico. En algunas descripciones, un régimen terapéutico puede comprender múltiples de tales ciclos; en algunas descripciones, un régimen puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ciclos.

En algunas descripciones, un régimen terapéutico sólo comprende un solo ciclo que incluye la administración del agente terapéutico; en algunas descripciones, un régimen terapéutico de este tipo puede comprender uno o más ciclos que incluyen las etapas (ii) y, opcionalmente, (iii) pero no incluyen administraciones adicionales del agente terapéutico.

20 En algunas descripciones, antes de la administración de un agente terapéutico tal como se describe en el presente documento se permite terapia de combinación en la que el agente con el que se combina el agente terapéutico muestra un índice terapéutico más amplio que cuando se administra solo (es decir, sin la administración previa de un agente terapéutico tal como se describe en el presente documento). En algunas descripciones, un índice terapéutico más amplio de este tipo es al menos uno mejorado en veces logarítmicas.

25 *Composiciones farmacéuticas*

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos humanizados o agentes de unión multiespecíficos de la presente descripción y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición, si se desea, también puede contener uno o más principios terapéuticamente activos adicionales.

30 Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración con receta a seres humanos, un experto en la técnica entenderá que tales composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de toda clase. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de proporcionar las composiciones adecuadas para la administración a diversos animales se entenderá bien, y el farmacólogo veterinario experto habitual en la técnica puede diseñar y/o realizar tal modificación con experimentación meramente habitual, si es que la hay.

35 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado de aquí en adelante en la técnica de la farmacología. En general, tales métodos preparatorios incluyen la etapa de poner en contacto el principio activo junto con un diluyente u otro excipiente y/o uno o más de otros componentes auxiliares, y luego, si es necesario y/o deseable, dar forma y/o envasar el producto en una unidad de dosis única o múltiple deseada.

40 Una composición farmacéutica según la presente descripción puede prepararse, envasarse y/o venderse a granel, como una dosis unitaria individual y/o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de una dosificación de este tipo tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de una dosificación de este tipo.

45 Las cantidades relativas del principio activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier componente adicional en una composición farmacéutica según la descripción variarán dependiendo de la identidad, el tamaño y/o estado del sujeto tratado y dependiendo además de la vía por la que va a administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) de principio activo.

55 Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable que, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquiera y todos de disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes, y similares, adecuados para la forma de dosificación particular deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) da a conocer diversos excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus

derivados, tales como produciendo cualquier efecto biológico no deseable o interactuando de otro modo de una manera perjudicial con cualquier/cualesquiera otro(s) componente(s) de la composición farmacéutica, se contempla que su uso esté dentro del alcance de esta descripción.

5 En algunas descripciones, un excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% puro. En algunas descripciones, un excipiente se aprueba para su uso en seres humanos y para uso veterinario. En algunas descripciones, un excipiente se aprueba por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos. En algunas descripciones, un excipiente es de calidad farmacéutica. En algunas descripciones, un excipiente cumple las normas de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

10 Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes de dispersión y/o granulación, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes de tamponamiento, agentes lubricantes y/o aceites. Tales excipientes pueden incluirse opcionalmente en formulaciones farmacéuticas. Excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y/o perfumantes pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

15 Las consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

20 *Kits*

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases rellenos con al menos un anticuerpo humanizado o agente de unión multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) tal como se describe en el presente documento. Los kits pueden usarse en cualquier método aplicable, incluyendo, por ejemplo, de manera terapéutica o de manera diagnóstica. Opcionalmente, asociados con tal(es) envase(s) puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja (a) la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos, (b) indicaciones para su uso, o ambos.

25 Otras características de la invención resultarán evidentes en el transcurso de las siguientes descripciones de realizaciones a modo de ejemplo, que se proporcionan para la ilustración de la invención y no se pretende que sean limitativas de la misma.

30 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos habituales en la técnica cómo elaborar y usar los métodos y las composiciones descritos en el presente documento, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. A menos que se indique lo contrario, la temperatura se indica en grados centígrados, y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1. Caracterización *in vitro* de huA33-C825

Entre otras cosas, la presente descripción abarca la idea de que el anticuerpo A33 humanizado (huA33) era de particular interés para construir agentes de unión multiespecíficos (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico). Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, los presentes inventores propusieron que la dosis tumoral subóptima y el índice terapéutico observados para huA33 monoespecífico radiomarcado (por ejemplo, ¹³¹I-huA33) podrían superarse empleando huA33 en un formato multiespecífico.

40 Este ejemplo describe la producción de anticuerpos biespecíficos compuestos por un primer sitio de unión a antígeno basado en anticuerpo A33 humanizado y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un hapteno de molécula pequeña (por ejemplo, ácido bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético [DOTA-Bn]). Los datos presentados en el presente documento describe la exitosa producción de anticuerpos biespecíficos (denominados huA33-C825) para seleccionar como diana células de cáncer colorrectal. Tal como se describe en el presente documento, se ligó un fragmento Fv de cadena sencilla (ScFv) anti-DOTA-Bn basado en un anticuerpo 2D12.5 madurado por afinidad al extremo carboxílico de una cadena ligera de A33 humanizado. Un inconveniente principal en el desarrollo de agentes de anticuerpo para radioinmunoterapia dirigida previamente (PRIT) ha sido la sobreexposición a radiación en tejidos normales, la inmunogenicidad, la dosis tumoral subóptima y un bajo índice terapéutico. Tal como se demuestra a continuación, los anticuerpos biespecíficos de la presente descripción superan tales deficiencias y proporcionan posibilidades de PRIT eficaces para cánceres que expresan el antígeno A33 humano tal como el cáncer colorrectal.

55 Un análisis bioquímico de pureza a modo de ejemplo de huA33-C825 mediante SE-HPLC se expone en la figura 1. El SE-HPLC mostró un pico principal (el 90% mediante análisis de UV) con un peso molecular aproximado de 210 KDa, así como algunos picos menores que se supone que son agregados que pueden retirarse mediante

filtración en gel. El anticuerpo biespecífico permaneció estable mediante SE-HPLC y Biacore después de múltiples ciclos de congelación y descongelación. La afinidad de unión se midió mediante Biacore T100. Los resultados a modo de ejemplo se exponen en la tabla 3. Los sensogramas a modo de ejemplo se exponen en la figura 2.

TABLA 3

Antígeno	Agente	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
A33 humano	huA33-IgG1	6,14E+05	1,05E-03	1,71E-09
	huA33-C825	9,15E+04	5,81E-03	6,35E-08
BSA-DOTA-Bn(Y)	hu3F8-C825	1,60E+04	3,37E-04	2,12E-08
	huA33-C825	1,90E+04	2,20E-04	1,16E-08

Tal como se muestra en este ejemplo, huA33-C825 demostró una menor afinidad por el antígeno A33 humano en comparación con el anticuerpo huA33 monoespecífico (K_D de 63,5 nM frente a 1,71 nM, figura 2A). HuA33-C825 retuvo una alta afinidad de unión por BSA-(Y)-DOTA-Bn (K_D de 11,6 nM) en comparación con un anticuerpo biespecífico de control que tiene un primer sitio de unión a antígeno que no se une al antígeno A33 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a DOTA-Bn (metal) (K_D de 21,2 nM, figura 2B). Tomado en conjunto, este ejemplo demuestra la construcción de un anticuerpo biespecífico que se une al antígeno A33 humano y un hapteno de molécula pequeña (por ejemplo, DOTA-Bn) que retiene alta afinidad por ambas dianas. Además, la reducción en afinidad por el antígeno A33 humano observada en huA33-C825 proporciona un aclaramiento más rápido en comparación con el anticuerpo huA33-IgG1 parental.

Ejemplo 2. Optimización de PRIT con huA33-C825, agente de aclaramiento a base de dextrano (dextrano-CA) y ^{177}Lu -DOTA-Bn

Este ejemplo demuestra la eficacia de un agente de unión multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) para radioinmunoterapia dirigida previamente (PRIT) para tumores positivos para A33. En particular, este ejemplo describe la optimización de la selección como diana de tumores en un protocolo de radioinmunoterapia dirigida previamente (PRIT) en roedores que portan tumores SW1222 empleando el anticuerpo biespecífico descrito en el ejemplo 1 en función de la cantidad de un agente de aclaramiento (CA). Tal como se muestra a continuación, con dosis crecientes se observa un aumento progresivo en el índice terapéutico, pero también una reducción en la captación tumoral absoluta.

Se seleccionó una dosis de 0,25 mg/ratón de huA33-C825 basándose en estudios piloto de biodistribución en ratones que portan tumores SW1222 a las 24 h p.i. de ^{177}Lu -DOTA-Bn usando 0,1-0,6 mg de huA33-C825 (0,48-2,86 nmol), y razones fijas de CA y ^{177}Lu -DOTA-Bn (5,6 MBq), que muestran una meseta de ~15-18% de DI/g para la concentración de la actividad de ^{177}Lu en el tumor a 0,25-0,6 mg de huA33-C825. A continuación, se realizaron experimentos de biodistribución adicionales para optimizar la dosis de CA durante la PRIT con 0,25 mg (1,19 nmol) como la dosis de huA33-C825. Se inyectaron grupos de ratones que portan tumores ($n =$ de 3 a 4 por grupo) con huA33-C825, seguido 24 h después con o bien: solución salina (es decir, vehículo), el 2,4% (p/p, con respecto a 0,25 mg de dosis de huA33-C825), el 5% (p/p), el 10% (p/p) o bien el 25% (p/p) de dosis de CA (0-62,5 μg /ratón). Después de 4 h adicionales, se inyectaron los ratones con 5,6 MBq de ^{177}Lu -DOTA-Bn, y se sacrificaron 24 h después para el análisis de biodistribución. La optimización a modo de ejemplo del agente de aclaramiento se muestra en las figuras 3A-3D. Las actividades de ^{177}Lu -DOTA-Bn a modo de ejemplo en tumor SW1222 y diversos tejidos normales para los grupos de ratones a los que se les dieron el 25% (p/p) de dosis de CA se muestran en las figuras 4A-4D.

Tal como se esperaba, la dosis de CA tuvo un impacto significativo sobre la actividad de ^{177}Lu circulante (es decir, sangre) (desde ~8 para el 0,1% de DI/g para solución salina (sin CA) hasta el 25% (p/p), respectivamente). Además, la dosis de CA parecía reducir la capacidad de captación de ^{177}Lu -DOTA-Bn posterior en el tumor. La dosis de CA más alta sometida a prueba (25% (p/p)) se consideró óptima ya que las razones de tumor con respecto a órgano normal para los tejidos con la radiosensibilidad más alta (sangre y riñón) eran más altas en comparación con dosis menores de CA, aunque a expensas de una reducción en la captación tumoral de ^{177}Lu -DOTA-Bn en comparación con PRIT con solución salina (~50% menos de captación). Específicamente, la captación tumoral (como el % de DI/g, promedio \pm error estándar de la media) de ^{177}Lu -DOTA-Bn fue de $17,51 \pm 0,90$ ($n = 3$) y $8,46 \pm 3,74$ ($n = 4$) para solución salina y al nivel de dosis de 65 μg (25% (p/p)) para CA, respectivamente. Para la solución salina, las razones de tumor con respecto a órgano para sangre, riñón y músculo fueron de $2,2 \pm 0,4$, $4,9 \pm 0,6$ y $23,2 \pm 3,8$, respectivamente. Al nivel de dosis de CA de 65 μg (25% (p/p)) para CA, las razones de tumor con respecto a órgano para sangre, riñón y músculo fueron $105,8 \pm 52,3$, $18,4 \pm 13,4$ y $282,1 \pm 208,7$, respectivamente. A continuación, los estudios de valoración de dosis de ^{177}Lu -DOTA-Bn se realizaron usando las dosis de PRIT optimizadas para huA33-C825 y CA. Para estudios de valoración de dosis de ^{177}Lu -DOTA-Bn, los datos de biodistribución de la actividad de ^{177}Lu para tumor y tejidos seleccionados críticos (sangre, hígado, bazo y riñones) se comparó entre los grupos de dosis de ^{177}Lu -DOTA-Bn, tanto el % de DI/g como la captación absoluta (kBq/g; véase la figura 4A, 4B). Finalmente, se realizó un experimento de biodistribución en un único punto de tiempo a las 24 h p.i. de huA33-C825 marcado con trazas de ^{131}I (0,39-0,40 MBq con huA33-C825 frío añadido a 1,19 nmol) en ratones que portan tumores

SW1222 para estimar la captación absoluta de anticuerpo de huA33-C825 en tumor (como pmol/g) durante la PRIT. Los valores tabulados a modo de ejemplo se exponen en la tabla 4 (los datos se presentan como media \pm DE). Los cálculos de la captación tumoral a modo de ejemplo se muestran en la figura 4D.

- 5 Tal como se muestra en este ejemplo, la captación de ^{131}I -huA33-C825 en tumor (promedio \pm desviación estándar) fue del $3,71 \pm 0,97\%$ de DI/g. Esto corresponde a una captación absoluta de huA33-C825 de 44 pmol/g (teniendo en cuenta $\sim 50\%$ de fracción inmunorreactiva, entonces 88 pmol/g).

TABLA 4

Estudio de biodistribución a las 24 h p.i. tras inyección i.v. de ^{131}I -A33-C825 (0,39-0,40 MBq, 0,25 mg/1,19 nmol) en ratones que portan tumores SW1222 (n = 5).

Tejidos	24 h
Sangre	5,05 \pm 0,97
Corazón	2,10 \pm 0,31
Pulmones	2,35 \pm 0,52
Hígado	2,04 \pm 0,53
Bazo	1,36 \pm 0,30
Estómago	6,92 \pm 3,06
Intestino delgado	0,98 \pm 0,35
Intestino grueso	0,83 \pm 0,40
Riñones	1,77 \pm 0,31
Músculo	0,49 \pm 0,06
Hueso	0,71 \pm 0,20
Tumor	3,71 \pm 0,97
Tamaño tumoral (g)	0,86 \pm 0,34

Ejemplo 3. Biodistribución y cálculo de dosis absorbida

- 10 El huA33-C825 descrito en los ejemplos anteriores se sometió a prueba para determinar su eficacia *in vivo*. Se determinaron la biodistribución de DOTA-Bn radiomarcado y estimaciones de la dosis absorbida en ratones implantados con células tumorales SW1222.

- 15 En este ejemplo, se llevó a cabo PRIT en grupos de ratones que portan tumores SW1222 positivos para A33 con las dosis óptimas de huA33-C825 y CA, seguido por 2,0 MBq (~ 10 pmol) de ^{177}Lu -DOTA-Bn, y se llevaron a cabo estudios de biodistribución a partir de 2-120 h p.i. de ^{177}Lu -DOTA-Bn para determinar el tiempo de residencia de la actividad de ^{177}Lu en tumor y diversos tejidos normales.

- 20 En resumen, la actividad de ^{177}Lu en tumor y diversos tejidos normales se determinó usando un ensayo de biodistribución tras la PRIT con dosis óptimas de A33-C825 (0,25 mg/ratón) y agente de aclaramiento a base de dextrano (25% (p/p), 62,5 μg) y 2,0 MBq (~ 10 pmol) de ^{177}Lu -DOTA-Bn. A los grupos de ratones que portan tumores SW1222 (n = de 4 a 5) se les administraron 250 μg de huA33-C825, seguido 24 h después con el 25% (p/p) (62,5 μg) de agente de aclaramiento a base de dextrano, y después de 4 h adicionales, 2,0 MBq (~ 10 pmol) de ^{177}Lu -DOTA-Bn. Se sacrificó un único grupo de animales a las 2, 24 y 120 h p.i. de ^{177}Lu -DOTA-Bn para el análisis de biodistribución. Estos datos se usaron tal como se describe en Materiales y métodos para estimar las dosis absorbidas para la radioinmunoterapia con ^{177}Lu -DOTA-Bn (tabla 5).

- 25 Para el tumor, la captación de ^{177}Lu se produjo muy rápidamente tras la administración, con un promedio del 7,0% de DI/g a las 2 h p.i. La captación tumoral máxima fue del 8,5% de DI/g a las 24 h p.i. y disminuyó en aproximadamente la mitad hasta el 4,0% de DI/g a lo largo de las siguientes 96 h a 120 h p.i.. La captación máxima en riñón, hígado, bazo y sangre se observó a las 2 h p.i. (el 0,87, el 0,70, el 0,92 y el 0,75% de DI/g, respectivamente; valores promedio), y disminuyó (también valores promedio) hasta el 0,27 (reducción de 3,2 veces en comparación con la captación máxima), 0,30 (reducción de 2,3 veces), el 0,32 (reducción de 2,9 veces) y el 0,02% (reducción de 37,5 veces) de DI/g (también valores promedio), respectivamente.
- 30

- Las estimaciones a modo de ejemplo de dosis absorbidas para tumor y tejido normal seleccionado en ratones atímicos hembra que portan tumores de cáncer colorrectal positivos para A33 s.c. para PRIT incluyendo las dosis óptimas de huA33-C825 y agente de aclaramiento a base de dextrano se exponen en la tabla 6. Para cada región diana, la dosis absorbida se calculó como el producto de la constante de dosis de equilibrio de ^{177}Lu para radiaciones no penetrantes (es decir, rayos beta) y la actividad acumulada de ^{177}Lu en las regiones diana, suponiendo la absorción local completa de los rayos beta de ^{177}Lu e ignorando contribuciones de rayos gamma y de
- 35

no autodosis.

TABLA 5

Tejido	2 h (n = 5)	24 h (n = 4)	120 h (n = 5)
Sangre	0,75 ± 0,16	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Corazón	0,30 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,05 ± 0,01
Pulmones	0,59 ± 0,10	0,21 ± 0,07	0,06 ± 0,02
Hígado	0,70 ± 0,14	0,43 ± 0,09	0,30 ± 0,03
Bazo	0,92 ± 0,15	0,47 ± 0,14	0,32 ± 0,12
Estómago	0,15 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Intestino delgado	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Intestino grueso	0,17 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Riñones	0,87 ± 0,09	0,46 ± 0,27	0,27 ± 0,09
Músculo	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,00
Hueso	0,09 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,00
Tumor	6,99 ± 1,24	8,46 ± 3,74	3,99 ± 0,44
Tamaño tumoral (g)	1,31 ± 0,50	1,08 ± 0,45	0,98 ± 0,32
Razones de tumor con respecto a tejido	2 h (n = 5)	24 h (n = 4)	120 h (n = 5)
Sangre	9,3 ± 2,6	107,2 ± 54,0	181,0 ± 62,1
Corazón	23,7 ± 6,1	78,1 ± 41,3	78,6 ± 22,3
Pulmones	11,8 ± 3,0	40,2 ± 22,4	64,4 ± 25,0
Hígado	10,0 ± 2,7	19,5 ± 9,5	13,5 ± 2,2
Bazo	7,6 ± 1,8	18,0 ± 9,7	12,5 ± 4,8
Estómago	46,6 ± 13,5	225,0 ± 113,5	166,2 ± 50,5
Intestino delgado	49,7 ± 11,6	182,0 ± 91,8	210,5 ± 43,9
Intestino grueso	41,5 ± 11,2	177,8 ± 89,8	104,3 ± 49,2
Riñones	8,1 ± 1,7	18,3 ± 13,4	14,8 ± 4,9
Músculo	58,6 ± 12,4	285,3 ± 212,8	249,4 ± 58,6
Hueso	78,0 ± 22,4	293,8 ± 211,5	149,5 ± 31,0

TABLA 6

Tejidos	cGy/MBq	Índice terapéutico
Sangre	0,9	73
Tumor	65,8	
Corazón	1,4	47
Pulmón	1,8	37
Hígado	6,3	10
Bazo	6,6	10
Estómago	0,6	110
Intestino delgado	0,5	132
Intestino grueso	0,8	82
Riñones	5,3	12
Músculo	0,3	219
Hueso	0,6	110

5

Tal como se muestra en la tabla 6, las dosis absorbidas estimadas de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (como cGy/MBq) para sangre, tumor, hígado, bazo y riñones fueron de 0,9, 65,8, 6,3, 6,6 y 5,3, respectivamente. Además, para un tratamiento de un solo ciclo, un índice terapéutico de 73 para tumor con respecto a sangre, y 12 para riñón, indica intervalos curativos para la selección como diana de tumores, sin mayor toxicidad de la esperada. De hecho, no se observó toxicidad más allá de 140 días en los sujetos con respuestas duraderas.

10

La captación tumoral después de PRIT evaluada mediante obtención de imágenes por PET demostró resultados similares como el ensayo de biodistribución anterior tanto con los isotipos ⁸⁶Y-DOTA-Bn como con ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (datos no mostrados).

Ejemplo 4. Estudio de terapia *in vivo*

15

Este ejemplo ilustra la eficacia *in vivo* de un anticuerpo biespecífico huA33-C825 en radioinmunoterapia dirigida previamente para mediar una reducción en la carga tumoral en ratones que portan células cancerosas positivas para

A33. En particular, este ejemplo describe el efecto de terapia de un solo ciclo y de ciclo dual sobre la carga tumoral en ratones que portan tumores SW1222.

5 Durante el primer estudio de terapia, se trataron 5 grupos de ratones que portan tumores ($n = 6$ a 8 por grupo) con: o bien vehículo (es decir, no tratados, $n = 8$, TV_7 : $76 \pm 15 \text{ mm}^3$), $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ solo (vehículo dado durante las inyecciones de anticuerpo biespecífico y CA, $n = 6$, TV_7 : $116 \pm 23 \text{ mm}^3$), PRIT con IgG-C825 de un solo ciclo + $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (IgG-C825 n.e. dado en lugar de huA33-C825, $n = 8$ TV_7 : $100 \pm 10 \text{ mm}^3$), o bien PRIT con huA33-C825 de un solo ciclo + o bien $11,1 \text{ MBq}$ o bien $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (ambos $n = 8$, TV_7 : $103 \pm 17 \text{ mm}^3$ y TV_7 : $93 \pm 15 \text{ mm}^3$, respectivamente). Las dosis absorbidas estimadas para tumor para PRIT con huA33-C825 de un solo ciclo + o bien $11,1 \text{ MBq}$ o bien $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ fueron de 730 y 2190 cGy , respectivamente (basándose en las estimaciones de dosis absorbidas a partir de la tabla 6). Los inventores observaron que la captación tumoral relativa disminuyó a media que se aumentó la dosis de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ durante el tratamiento, lo que puede indicar que se aproxima a una posible saturación en el tumor. Esto puede incidir en la dosis tumoral absorbida estimada. Si un 7% de DI/g estimada se usa para determinar la captación tumoral máxima (es decir, para tener en cuenta la captación tumoral relativa reducida con la mayor dosis de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$) tras PRIT + dosis de $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$, entonces una dosis absorbida tumoral estimada de $\sim 1800 \text{ cGy}$ puede ser más precisa, lo que sugiere en general un intervalo de dosis eficaz de $1800\text{-}2200 \text{ cGy}$. La respuesta tumoral a modo de ejemplo (representada como volumen tumoral [mm^3]) entre los ratones de cada grupo de tratamiento con $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ se expone en la figura 5. Los grupos de ratones que portan tumores que o bien no reciben tratamiento, tratamiento que consiste en o bien $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ solo, o bien PRIT con IgG-C825 de un solo ciclo + $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ no mostraron respuestas tumorales. La gammagrafía de los dos últimos grupos a los que se les administró $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ mostraron una actividad mínima en la región tumoral. En cambio, los grupos tratados con PRIT con huA33-C825 de un solo ciclo + o bien $11,1 \text{ MBq}$ o bien $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ mostraron un ligero retardo del crecimiento de los tumores hasta ~ 15 días tras el tratamiento, pero no produjeron una RC. Para la comparación, en el día 23 tras la inoculación del tumor (16 días tras la inyección de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$), los volúmenes tumorales (como promedio \pm EEM) fueron de 1398 ± 206 ($n = 8$), 1051 ± 167 ($n = 5$), 877 ± 109 ($n = 7$), 694 ± 138 ($n = 8$) y 495 ± 76 ($n = 8$) para sin tratamiento, $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ solo, PRIT con IgG-C825 de un solo ciclo + $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$, o PRIT con huA33-C825 de único ciclo + o bien $11,1 \text{ MBq}$ o bien $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$, respectivamente. En un plazo de 30 días tras la inoculación del tumor, el tamaño tumoral promedio de todos los grupos fue de $\geq 1250 \text{ mm}^3$, y se terminó el estudio. Se observaron resultados similares con un tratamiento de PRIT con huA33-C825 de un solo ciclo de dosis mayor + $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ con $111,1 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (datos no mostrados).

En un segundo estudio de terapia, se investigó un tratamiento de PRIT con huA33-C825 de ciclo dual. La respuesta tumoral a modo de ejemplo (representada como volumen tumoral [mm^3]) entre los ratones que reciben tratamiento de ciclo dual se expone en las figuras 6A-6D.

35 Cuando no se les administró a los ratones ningún tratamiento ($n = 5$ / TV_{10} : $314 \pm 77 \text{ mm}^3$), todos los ratones requirieron sacrificio en un plazo de 30 días debido a una carga tumoral excesiva, y el tiempo para alcanzar 500 mm^3 fue de $13 \pm 2 \text{ d}$. El tratamiento con dos ciclos de PRIT + $11,1 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (dosis total de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ de $22,2 \text{ MBq}$; dosis tumoral estimada de 1460 cGy) ($n = 5$ / TV_{10} : $462 \pm 179 \text{ mm}^3$), 2/5 animales mostraron RC (figura 6A). En los tumores recurrentes, el tiempo para alcanzar 500 mm^3 fue de 9 d (TV_{10} : 391 mm^3) o 36 d (TV_{10} : 712 mm^3). El tratamiento con 2 ciclos de PRIT + $33,3 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (dosis total de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ de $66,6 \text{ MBq}$; dosis tumoral estimada $3600\text{-}4400 \text{ cGy}$) ($n = 5$ / $344 \pm 105 \text{ mm}^3$) produjo RC (figura 6B) en 5/5 animales. En estos tumores recurrentes, el tiempo para alcanzar 500 mm^3 fue de 12 d (TV_{10} : 325 mm^3), 65 d (TV_{10} : 502 mm^3), 7 d (TV_{10} : 341 mm^3) y 23 d (TV_{10} : 345 mm^3), y un único ratón tuvo un tamaño tumoral de $<10 \text{ mm}^3$ en el momento del sacrificio. El tratamiento con dos ciclos de PRIT + $55,5 \text{ mCi}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (dosis total de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ de $111,0 \text{ MBq}$; dosis tumoral estimada: 2580 cGy , basándose en la captación tumoral máxima del 3% de DI/g) ($n = 4$ / $236 \pm 54 \text{ mm}^3$) produjo RC en 4/4 animales (figura 6C). En estos tumores recurrentes, el tiempo para alcanzar 500 mm^3 fue de 34 d (TV_{10} : 295 mm^3), 45 d (TV_{10} : 263 mm^3) y 42 d (TV_{10} : 175 mm^3), y un único ratón tuvo un tamaño tumoral de 44 mm^3 en el momento del sacrificio. Tras el tratamiento con dos ciclos de PRIT + $33,3 \text{ mCi}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (dosis total de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$: $66,6 \text{ MBq}$), el tiempo de recaída promedio para 500 mm^3 fue de $27 \pm 26 \text{ d}$. Para el tratamiento con dos ciclos de PRIT + $55,5 \text{ MBq}$ de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (dosis total de $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$: 111 MBq), el tiempo de recaída promedio para 500 mm^3 fue de $40 \pm 6 \text{ d}$. Las estimaciones a modo de ejemplo de dosis de radiación absorbidas (representadas en unidades Gy) para cada régimen de tratamiento se expone en la tabla 7.

TABLA 7

Grupo de tratamiento	Tumor	Sangre	Riñón	Respuesta completa	Curas a los 40 d tras el tratamiento
<i>Controles</i>					
No seleccionado como diana previamente con 11,1 MBq				0/5	0/5
No seleccionado como diana previamente con 33,3 MBq				0/6	0/6
IgG-C825 + 11,1 MBq				0/5	0/5
IgG-C825 + 33,3 MBq				0/7	0/7
<i>Un solo ciclo</i>					
huA33-C825 + 11,1 MBq	7,3	0,1	0,6	0/8	0/8
huA33-C825 + 33,3 MBq	21,9	0,3	1,8	0/8	0/8
<i>Ciclo dual</i>					
huA33-C825 + 11,1 MBq (x2); 22,2 MBq	14,6	0,2	1,2	2/5	1/5
huA33-C825 + 33,3 MBq (x2); 66,6 MBq	43,8	0,6	3,5	5/5	2/5
huA33-C825 + 55,5 MBq (x2); 111,0 MBq	73,0	1,0	5,9	4/4	2/4
<i>Ciclo triple</i>					
huA33-C825 + 55,5 MBq (x3); 165,0 MBq	140	1,5	8,8	10/10	10/10

Se observaron tendencias similares para la supervivencia en animales a los 140 días tras el tratamiento (datos no mostrados).

5 Ejemplo 5. Toxicidad

Este ejemplo ilustra la toxicidad *in vivo* de anticuerpos biespecíficos A33 humanizados descritos en los ejemplos anteriores.

En resumen, se presentaron un total de seis ratones tratados con o bien dos ciclos de PRIT + 11,1 MBq de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (n = 3) o bien dos ciclos de PRIT + 1,5 mCi de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (n = 3) para la evaluación de patología anatómica de riñón, médula ósea, hígado y bazo hasta 9 semanas tras el tratamiento. Los 3/5 ratones que no mostraron RC durante después del tratamiento con dos ciclos de PRIT + 0,3 mCi de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn se presentaron cinco días tras la inyección de la segunda dosis de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (es decir, tras el tratamiento). Estos ratones no mostraron ninguna reducción en el tamaño tumoral tras el tratamiento, y requirieron sacrificio debido a la carga tumoral excesiva. En 3/3 ratones, el riñón y la médula ósea eran normales, lo que sugería ninguna toxicidad inducida por la radiación. Para 1/3 ratones, el hígado mostró hematopoyesis extramedularmente, y el hígado era normal para los otros dos dentro del grupo. Para 1/3 ratones, el bazo (pulpa blanca) mostró hiperplasia linfocitaria folicular, y el bazo era normal para los otros dos dentro del grupo. Para los ratones tratados con dos ciclos de PRIT + 55,5 MBq, se presentó un único ratón siete semanas tras el tratamiento, mientras que los otros dos se presentaron nueve semanas tras el tratamiento. Todos de los tres de estos ratones mostraron una RC, seguido de reaparición del tumor, y requirieron sacrificio debido a la carga tumoral excesiva. Para 3/3 ratones, el riñón, la médula ósea y el hígado eran normales. Para 1/3 ratones, el bazo (pulpa blanca) mostró hiperplasia linfocitaria folicular, y el bazo era normal para los otros dos dentro del grupo.

Este ejemplo sólo confirma, entre otras cosas, que huA33-C825 reduce de manera eficaz la carga tumoral (es decir, reduce el crecimiento tumoral) *in vivo* y proporciona una PRIT eficaz.

25 Ejemplo 6. PRIT terapéutica curativa

Este ejemplo documenta el uso de anticuerpos biespecíficos A33 humanizados descritos en los ejemplos anteriores, y, entre otras cosas, demuestra que los tratamientos que usan estos anticuerpos pueden ser curativos. Específicamente, demuestra regímenes de tratamiento curativos terapéuticos que incluían ciclos de tratamiento adicionales con cantidades totales aumentadas de actividad administrada.

Se sometieron a tratamiento ratones desnudos que portaban xenoinjertos s.c. de SW1222 establecidos (n = 20; volumen tumoral = 102 ± 40 mm³; promedio ± desviación estándar (DE)) (n = 5-10/grupo) con: o bien sin tratamiento (n = 5), ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn solo (n = 5), o bien un régimen de PRIT de tres ciclos que consistía en PRIT con anticuerpo anti-GPA33 + 55 MBq de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (n = 10; total: 165 MBq). Se realizó obtención de imágenes por nanoSPECT/CT en serie sobre cinco ratones seleccionados al azar que se sometieron a DPRIT hasta 160 horas tras la inyección del primer ciclo de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn para los cálculos de dosimetría.

La DPRIT indujo una respuesta tumoral completa en 10/10 ratones (controles: 10/10 muertos a los 21 días tras la inoculación del tumor), con supervivencia libre de tumores de todos los animales tratados a los 100 días y sin toxicidades evidentes. La autopsia de 5/10 ratones a los 100 días verificó las curas, así como no mostró hallazgos histopatológicos notables de la evaluación de riñón, hígado, bazo y hueso/médula (datos no mostrados). Las

estimaciones de dosimetría de exposición a radiación de ^{177}Lu al tumor tras el ciclo 1 era de 4556 ± 637 rad ($n = 5$, promedio \pm DE). Basándose en estos datos, a una aproximación de primer orden de exposición a radiación de ^{177}Lu total al tumor tras la DPRIT curativa (es decir, 3 ciclos) era de 14000 rad (con dosis de radiación en sangre y riñón de 150 rad (índice terapéutico (IT): 93) y 875 rad (IT: 16), respectivamente).

- 5 La obtención de imágenes por nanoSPECT/CT con lutecio-177 de animales tratados con régimen de PRIT de tres ciclos mostró un alto contraste con la captación visible en tumores y fondo tisular mínimo (datos no mostrados). IT \sim 70:1. Se observó la detección de tumores de 10 mg o menos, basándose en obtención de imágenes de la sección transversal no invasiva *in vivo* en ratones vivos. Este ejemplo sólo confirma, entre otras cosas, que huA33-C825 reduce de manera eficaz la carga tumoral *in vivo* y que un agente teranóstico basado en PRIT puede tener efectos curativos y/o puede usarse para detectar tumores pequeños.

Ejemplo 7. Tratamiento simultáneo teranóstico “en tiempo real” y dosimetría guiada por imagen

- 15 Este ejemplo documenta la respuesta *in vivo* a un régimen teranóstico de DOTA-PRIT usando anticuerpos biespecíficos A33 humanizados descritos en los ejemplos anteriores y demuestra la eficacia del tratamiento mediante el tratamiento simultáneo y la dosimetría guiada por imagen. Específicamente, se utilizó nanoSPECT/CT para la obtención de imágenes cuantitativa de alta resolución de ratones sometidos a tratamiento de DPRIT con ^{177}Lu para la dosimetría “en tiempo real”.

- 20 Se trató un ratón desnudo que porta tumores SW1222 (volumen: 100 mm^3 según la medición del compás calibrador Vernier) con un solo ciclo de PRIT con anticuerpo anti-GPA33 + 55 MBq de ^{177}Lu -DOTA-Bn y se sometió a obtención de imágenes mediante nanoSPECT/CT tres veces tras la inyección de ^{177}Lu -DOTA-Bn: a las 1, 24 y 160 horas tras la inyección. En la figura 8 se muestra las imágenes de nanoSPECT/CT de intensidad máxima de la región de la parte inferior del costado en la que se ubica el tumor. Las imágenes se corrigieron por la desintegración según el tiempo de inyección y se calibraron usando patrones de actividad conocidos. La concentración de la actividad en el tumor se determinó usando el análisis de la región de interés de las imágenes calibradas. Este ejemplo sólo confirma, entre otras cosas, que huA33-C825 reduce de manera eficaz la carga tumoral *in vivo* y que la obtención de imágenes cuantitativa de alta resolución es un método que puede usarse para medir la eficacia.

Materiales y métodos para los ejemplos

Líneas celulares tumorales y reactivos de cultivo celular

- 30 La línea celular de cáncer colorrectal humano SW1222 se obtuvo del Instituto Ludwig de Inmunoterapia para el Cáncer (Nueva York, NY) y se mantuvo por pase en serie. Las células se cultivaron en medio esencial mínimo complementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10%, glutamina 2,0 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 unidades/ml de estreptomycin en un ambiente a 37°C que contenía el 5% de CO_2 . Tras recibir la línea celular, se establecieron los cultivos y se crioconservaron en pequeñas alícuotas para limitar los pases a menos de tres meses, y se analizaron periódicamente para determinar el micoplasma según las especificaciones del fabricante utilizando un kit comercial (Lonza). Para la tripsinización durante el pase y la recogida de células, se usó una disolución de tripsina al 0,25%/EDTA 0,53 mM en solución salina tamponada de Hanks sin calcio y sin magnesio.

Clonación y expresión de huA33-C825

- 40 Se elaboró huA33-C825 usando la plataforma descrita anteriormente en Cheal, S. M. *et al.* (2014, Mol. Cancer Ther. 13 (7), 10 páginas) usando las regiones variables (V_H y V_L) del anticuerpo A33 humanizado (huA33; King, D.J. *et al.*, 1995, British J. Cancer 72:1364-1372). El huA33-C825 se produjo en células CHO en un vector de expresión de mamífero y se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína A tal como se describió (Cheal *et al.*, citado anteriormente).

- 45 Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo de la presente descripción se presentan en la tabla 8 (huA33-C825: IgG1 de A33 humanizado - scFv C825 murino; huA33-huC825: IgG1 de A33 humanizado - scFv C825 humanizado). Para las secuencias de ADN, las secuencias líderes se presentan como texto subrayado. Para las secuencias de aminoácidos, las secuencias líderes se presentan como texto subrayado, las secuencias de ligador se presentan como texto en negrita y las secuencias de región variable se presentan como texto en cursiva.

TABLA 8

ADN de cadena ligera de huA33-C825

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGACATCCAG
 ATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGTGTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACA
 TGCAAGGCCTCCAGAACGTGCGGACCGTGGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGG
 CCTGGCCCCCAAGACCCTGATCTACCTGGCCTCTAACCGGCACACCGGCGTGCCCTC
 CAGATTCTCCGGATCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTTCACCATCTCCAGCCTGCA
 GCCCGAGGATATCGCCACCTACTTTTGCAGCAGCACTGGTCCTACCCCTGACCTT
 TGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAGTGAAGAGAACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTCA
 TCTTCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCTGTGCCTGC
 TGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTG
 CAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTA
 CAGCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGT
 ACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACC
 GGGGCGAATGTGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGCTCTGCTTCTCACGTGAAG
 CTGAGGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGCAGCCTTCCCAGTCTCTGCTCCCTGACCTGC
 ACCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCGATTACGGCGTGCCTGGGTGCGACAGTCTCCA
 GGCAAGGGCTGGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGTGGCGGAACCGCCTACAA
 CACCGCCCTGATCTCCCGGCTGAACATCTACCGGGACAACTCCAAGAACCAGGTGTT
 CCTGGAAATGAACTCCCTGCAGGCAGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGAC
 GGGGCTCTACCCCTACAACCTACTTCGACGCTTGGGGCTGCGGCACCACCGTGACAG
 TGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCTGGGGGCGGAGGTAGCGGAGGGGGAGGTTCTCAG
 GCTGTCTGATCCAGGAATCTGCCCTGACCACCCCCCTGGCGAGACAGTGACACTG
 ACCTGCGGATCTTCCACCGGCGCTGTGACCGCCTCCAACCTACGCCAACTGGGTGCAG
 GAAAAGCCCGACCACTGCTTACCAGGCCTGATCGGCGGCCACAACAACAGACCTCC
 AGGCGTGCCAGCCCGTTCTCCGGCTCTCTGATCGGAGATAAGGCCGCCCTGACAAT
 CGCCGGCACCCAGACAGAGGACGAGGCTATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCG
 ACCACTGGGTCATCGGCGGAGGCCACCAGACTGACCGTGCTGGGATAG (SEQ ID
 NO:1)

Aminoácido de cadena ligera de huA33-C825

MGWSCIIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPLAPKT
 LIYLASNHRHTGVPSRFSGSGSDFTFTISSLQPEDIAFYFCQQHWSYPLTFGGQTKVEVKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSASH
 VKLQESGPGGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGGTAYNTALI
 SRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTTVTYSSGGGGSG
 GGGSGGGGSQAVVIQESALTTPPGETVTLTCSSTGAVTASNANWVQEKPDHCFGLIGG
 HNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWWIGGGTRTLTVLG (SEQ
 ID NO:2)

Aminoácido de cadena ligera de huA33-huC825 (ligador de 15 aa)

*MGWSCIIFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGGLAPKT
LIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYFCQQHWSYPLTFGGQGTKVEVKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSG
GGGSHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGG
TAYNTALISRFITSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGLTIVSSG
GGGSGGGGSGGGGSAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTASNANWVQQKPGQCP
RGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTV
LG (SEQ ID NO:3)*

Aminoácido de cadena ligera de huA33-huC825 (ligador de 30 aa)

*MGWSCIIFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGGLAPKT
LIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYFCQQHWSYPLTFGGQGTKVEVKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSG
GGGSHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGG
TAYNTALISRFITSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGLTIVSSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAV
TASNANWVQQKPGQCPRLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYC
ALWYSDHWVIGGGTKLTVLG (SEQ ID NO:4)*

ADN de IgG1 de cadena pesada de huA33-C825 (aglicosilado)

*ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGAGGTGCAG
CTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGT
GCCGCCTCTGGCTTCGCCTTCTCCACCTACGACATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCT
GGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTTCCGGCGGCTCCTACACCTACTAC
CTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACTCCTCCAAGAACACCCTG
TACCTGCAGATGAACTCCCTGCAGGCCGAGGACTCCGCCATCTACTACTGTGCCCT
ACCACCGTGGTGCCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTCT
GCTTCTACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCCGTCTCT
ACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCCA
GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCCTGTGGTACGCGTCC
TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC
AGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
TCCGACGGTCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO:5)*

Aminoácido de IgG1 de cadena pesada de huA33-C825 (aglicosilado)

*MGWSCIIFLVATATGEVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGL
EWWATISSGGSYTYLDSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVVFAWYWGQ*

GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:6)

Aminoácido de IgG1 de cadena pesada de huA33-C825 (aglicosilado, K322A)

MGWSCILFLVATATGEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGL
 EWWATISSGGSYTYLDSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWQG
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:7)

Estudios de resonancia de plasmón superficial

- 5 El biosensor Biacore T100, el chip sensor CM5 y los reactivos relacionados se adquirieron de GE Healthcare. La proteína A33 humana recombinante se adquirió de Novoprotein. Se preparó un conjugado BSA-(Y)-DOTA-Bn tal como se describió (Cheal *et al.*, citado anteriormente). Los antígenos A33 y DOTA se inmovilizaron usando el kit Amino Coupling (GE Healthcare). Se analizaron anticuerpos biespecíficos purificados y anticuerpos de control, y los datos se ajustaron a un modelo de analito bivalente usando el software de evaluación Biacore T100 tal como se describió (Cheal *et al.*, citado anteriormente).

Reactivos, protocolo y estudios de xenoinjerto de PRIT

- 10 Todos los experimentos con animales se aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Centro de Cáncer Memorial Sloan Kettering y se siguieron las directrices institucionales para el uso apropiado y humano de los animales en la investigación. Se permitió que ratones hembra nu/nu atímicos (6-8 semanas de edad; Harlan Sprague Dawley) se aclimataran en el animalario durante al menos una semana. Se inyectaron s.c. los grupos de animales con SW1222 positivo para A33 en el costado izquierdo con 5×10^6 células formuladas 1:1 con Matrigel (BD Biosciences) y se observaron los tumores establecidos (100-900 mm²) en 7-10 días usando la fórmula para el volumen de un elipsoide $V = 4/3\pi(\text{largo}/2 \times \text{ancho}/2 \times \text{alto}/2)$. Todos los reactivos se administraron por vía intravenosa (i.v.) a través de la vena lateral de la cola. El protocolo de PRIT incluía inyecciones de: huA33-C825 [t = -28 h], seguido 24 h después por CA (el CA es un conjugado de dextrano-(Y)-DOTA-Bn de 500 KDa, preparado según Orcutt *et al.* (2011, Nucl. Med. Biol. 38: 223-233) y formulado en solución salina para inyección; la razón de sustitución de moles de (Y)-DOTA-Bn por moles de dextrano fue 6:1 (Y)-DOTA-Bn/dextrano [t = -4 h], y ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (preparado tal como se describió previamente mediante la incubación de aminobencil-DOTA (p-NH₂-Bn-DOTA) de Macrocylics y ¹⁷⁷LuCl₃ (actividad específica de ~30 Ci/mg; Perkin Elmer) y formulación en solución salina para inyección) después de 4 h [t = 0 h]. Además, huA33-C825 se radiomarcó con I-131 para estimar la captación tumoral durante PRIT. Se usó el método IODOGEN (Cheal, S. *et al.*, 2014, Mol. Cancer Ther. 13 (7): 1-10) para preparar ¹³¹I-huA33-C825 (actividad específica final de 95,5 MBq/mg, con huA33-C825 frío añadido para lograr la dosis en mg deseada, pureza radioquímica >98% usando cromatografía de líquidos de alta presión de exclusión molecular), y se evaluó la inmunorreactividad de unión celular *in vitro* usando células SW1222 esencialmente tal como se describe por el método Lindmo. (Lindmo, T. *et al.*, 1990, J. Immunol. Meth. 126 (2): 183-189). Para PRIT con IgG-C825 no específico, se usó una dosis en mg equivalente de un anticuerpo biespecífico dirigido a GD2 (hu3F8-C825) en lugar de huA33-C825. Para el análisis de biodistribución *ex vivo*, los ratones se sacrificaron por asfixia con CO₂ (g), y se recogieron el tumor y órganos seleccionados, se enjuagaron con agua y se dejaron secar al aire, se pesaron y se sometieron a radioensayo mediante recuento de centelleo por rayos gamma (Perkin Elmer Wallac Wizard 3[™]). Las tasas de recuento se corrigieron para el fondo y la desintegración, se convirtieron en actividades usando un factor de calibración del sistema, se normalizaron con respecto a la actividad administrada y se expresaron como el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% de DI/g). Las diferencias en la concentración de la actividad de ¹⁷⁷Lu en el tumor y en diversos tejidos se analizaron mediante la prueba de la t de Student para datos independientes cuando era apropiado.

Estimación de dosis absorbidas

- 40 A grupos de ratones que portan tumores SW1222 positivos para A33 (n = 4-5) se les administraron 0,25 mg de huA33-C825, CA (62,5 µg; 25% (p/p)) y 1,85-2,0 MBq (~10 pmol) de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn, y se sacrificaron a las 2, 24 y 120 h p.i. Para cada tejido, los datos de concentración de actividad con respecto al tiempo sin corrección para la desintegración se ajustaron usando Excel a una función exponencial de 1 componente, de 2 componentes o más compleja, según sea apropiado, y se integraron analíticamente para dar lugar a la concentración de actividad acumulada por actividad administrada unitaria (MBq-h/g por MBq). Se usó la constante de dosis de equilibrio de

¹⁷⁷Lu para las radiaciones no penetrantes (8,49 g-cGy/MBq-h) para estimar las dosis autoabsorbidas de tumor a tumor y de órgano a órgano seleccionado, suponiendo una absorción local completa de los rayos beta de ¹⁷⁷Lu e ignorando las contribuciones de los rayos gamma y de las dosis no propias. Para determinar el efecto de la dosis de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn en la captación relativa de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn en el tumor y tejidos seleccionados con las dosis más altas absorbidas (es decir, sangre, hígado, bazo y riñones), se les administró a grupos de ratones desnudos atímicos hembra que portan tumores SW1222 (n = 5/grupo) 0,25 mg (1,19 nmol) de huA33-C825 a t = -28 h y 62,5 µg de CA a t = -4 h, seguido de o bien 11,1 MBq (11,14-11,40), 55,5 MBq (54,61-55,06 MBq) o bien 111 MBq (109,52-112,5 MBq). Todos los grupos se sacrificaron a las 24 h p.i. de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (es decir, tiempo de captación tumoral máxima) para el análisis de biodistribución de la actividad de ¹⁷⁷Lu.

10 *Obtención de imágenes por PET de PRIT + ⁸⁶Y-DOTA-Bn*

A un solo grupo de ratones que portan tumores SW1222 positivos para A33 en el hombro (n = 5) se les administraron 0,25 mg de huA33-C825, CA (62,5 µg; 25% (p/p)) y 8,6-8,8 MBq (~50 pmol) de ⁸⁶Y-DOTA-Bn y se sometieron a obtención de imágenes de manera no invasiva usando un dispositivo microPET Focus 120 (CTI Molecular Imaging, Inc. Knoxville, TN) a aproximadamente 2 y 20 h pi. Se usaron los siguientes parámetros de adquisición de imágenes: ventana de energía de 350-750 keV, ventana de tiempo de coincidencia de 6 ns y un tiempo de adquisición de 20 min. Los datos del modo de lista resultante se clasificaron en histogramas de dos dimensiones mediante el agrupamiento de Fourier y las imágenes transversales se reconstruyeron mediante retroproyección filtrada en una matriz de 128 × 128 × 95 (la resolución espacial reconstruida es de 2,6 mm de anchura completa a la mitad del máximo (FWHM)). Los datos de la imagen se corrigieron para la falta de uniformidad de la respuesta del escáner, las pérdidas de recuento de tiempo muerto, la desintegración física (en el momento de la inyección) y la razón de ramificación de positrones de ⁸⁶Y. No se aplicó atenuación, dispersión o corrección de promedios de volumen parcial. Se usó un factor de calibración del sistema determinado empíricamente (es decir, µCi/ml/cps/vóxel) para ratones para convertir las tasas de recuento de vóxeles en concentraciones de actividad. Los datos de la imagen resultantes se normalizaron entonces a la actividad administrada para determinar mediante análisis de la región de interés el porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% de DI/g) de tejido corregido para la desintegración radiactiva en el momento de la inyección. Se usó el software Asipro VM 5.0 (Concorde Microsystems, Knoxville, TN) para realizar los análisis de imágenes y de regiones de interés (ROI) (como ROI máxima, % de DI/g). Los animales se sacrificaron a las 24 h p.i. para el análisis de biodistribución *ex vivo*.

30 *Autorradiografía e inmunohistoquímica*

El tumor y el riñón congelados e incrustados en OCT de ratones seleccionados a los que se administró PRIT con huA33-C825 seguido de o bien 11,1 (11,14-11,40), 55,5 (54,61-55,06) o bien 111 MBq (109,52-112,5 MBq) de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (momento del sacrificio: 24 horas pi) se cortaron en secciones de 10 µm usando un crióstato (Avantik, Springfield, NJ), y se expusieron inmediatamente en una placa de obtención de imágenes (Fuji Photo Film, Kanagawa, Japón) durante 72 h y posteriormente se escanearon con el escáner Typhoon FLA 7000 (GE, Pittsburg, PA). Las mismas secciones se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina y se escanearon con un microscopio Olympus BX60 equipado con una platina móvil controlada (Olympus, Central Valley, PA). Tanto las imágenes de autorradiograma como de microscopio se procesaron y analizaron usando ImageJ (NIH).

Estudios de terapia y gammagrafía

A grupos de ratones que portan xenoinjertos de SW1222 positivos para A33 s.c. establecidos se les inyectaron con o bien huA33-C825 o bien PRIT con IgG-C825 no específico (n.e.) (es decir, tratamiento de un solo ciclo, inyección de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn en el día 7 tras la inoculación del tumor) o dos ciclos de PRIT (es decir, estudio de tratamiento de ciclo dual, inyecciones de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn administradas en el día 10 y el día 17 tras la inoculación del tumor). Para el estudio de tratamiento de ciclo dual, se describe el volumen tumoral en el día 10 tras la inoculación del tumor (TV10) (es decir, el día de la primera inyección de ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn) y se expresa, cuando sea apropiado, como promedio ± DE. Las siguientes definiciones se usaron para describir la respuesta al tratamiento: una respuesta completa (RC) se define como la reducción del volumen tumoral hasta <100 mm³. Una respuesta duradera (RD) se definió como la supervivencia a los 140 días tras el tratamiento. La carga tumoral excesiva se define como >2000 mm³. Para los estudios de gammagrafía, se anestesiaron grupos seleccionados de ratones que portan tumores SW1222 positivos para A33 que se sometieron a tratamiento mediante inhalación de gas antes del barrido en un dispositivo nanoSPECT (Bioscan, Washington D.C.) a las 20 horas p.i. durante 30 minutos (~10⁵ recuentos por imagen) usando un colimador de alta resolución de baja energía y una ventana configurada a 208 keV. Las imágenes se reconstruyeron en una matriz 256 x 256 usando el software Bioscan HiSPECT y se cargaron en ASIPRO VM para su análisis.

55 **Bibliografía**

Ackerman, M.E. *et al.*, 2008, A33 antigen displays persistent surface expression, *Cancer Immunol. Immunother.* 57(7):1017-1027.

Ackerman, M.E. *et al.*, 2008, Effect of antigen turnover rate and expression level on antibody penetration into tumor

- spheroids, *Mol. Cancer Ther.* 7(7):2233-2240.
- Barendsward, E.C. *et al.*, 1998, Rapid and specific targeting of monoclonal antibody A33 to a colon cancer xenograft in nude mice, *International J. Oncol.* 12:45-53.
- Carrasquillo, J.A. *et al.*, 2011, ¹²⁴I-huA33 Antibody PET of Colorectal Cancer, *J. Nucl. Med.* 52:1173-1180.
- 5 Cheal, S.M. *et al.*, 2014, Preclinical Evaluation of Multistep Targeting of Diasialoganglioside GD2 Using an IgG-scFv Bispecific Antibody with High Affinity for GD2 and DOTA Metal Complex, *Mol. Cancer Ther.* 13(7):1-10.
- Cheal, S.M. *et al.*, 2014, Evaluation of glycodendron and synthetically-modified dextran clearing agents for mult-step targeting of radioisotopes for molecular imaging and radioimmunotherapy, *Mol. Pharm.* 11(2):400-416.
- 10 El Emir, E. *et al.*, 2007, Predicting Response to Radioimmunotherapy from the Tumor Microenvironment of Colorectal Carcinomas, *Cancer Res.* 67(24):11896-11905.
- Goodwin, D.A. *et al.*, 1994, Pharmacokinetics of pretargeted monoclonal antibody 2D12.5 and ⁸⁸Y-Janus-2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetraacetic acid (DOTA) in BALB/c mice with KHJJ mouse adenocarcinoma: a model for ⁹⁰Y radioimmunotherapy, *Cancer Res.* 54(22):5937-5946.
- 15 Heath J.K. *et al.*, 1997, The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *PNAS* 94, 469-474.
- King, D.J. *et al.*, 1995, Preparation and preclinical evaluation of humanised a33 immunoconjugates for radioimmunotherapy, *British J. Cancer* 72:1364-1372.
- Lindmo, T. *et al.*, 1990, Immunometric assay by flow cytometry using mixtures of two particle types of different affinity, *J. Immunol. Meth.* 126(2):183-189.
- 20 Orcutt, K.D. *et al.*, 2010, A modular IgG-scFv bispecific antibody topology, *Protein Engineering Design & Selection* 23(4):221-228.
- Orcutt, K.D. *et al.*, 2011, Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging, *Nucl. Med. Biol.* 38(2):223-233.
- 25 O'Donoghue, J.A. *et al.*, 2011, ¹²⁴I-huA33 antibody uptake is driven by a33 antigen concentration in tissues from colorectal cancer patients imaged by immuno-pet. *J. Nucl. Med.* 52:1878-1885.
- Scott, A. M. *et al.*, 2005, A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake, *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817.
- Welt, S. *et al.*, 1994, Phase I/II study of iodine 131-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer, *J. Clin. Oncol.* 12(8):1561-71.
- 30 Welt, S. *et al.*, 2003, Phase I study of anticolon cancer humanized antibody A33, *Clin. Cancer Res.* 9:1338-1346.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno y un segundo sitio de unión a antígeno,
- 5 en el que el primer sitio de unión a antígeno es una molécula de inmunoglobulina y el segundo sitio de unión a antígeno es un scFv, scFab, Fab o Fv,:
- y en el que el primer sitio de unión a antígeno incluye un dominio VL de secuencia
- DIQMTQSPSSLVSVGDRVTTTCKASQNVRTVVAVYQQKPLAPKTLIYLASNR ¶
HTGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDIATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKR; ¶
- y un dominio VH de secuencia
- EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGLEWVATISS ¶
GGSYTYYLDSVKGRFTISRDNSSKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYW ¶
10 GQGITLVTVSS; ¶
- y en el que el segundo sitio de unión a antígeno incluye o bien un dominio VH de secuencia
- HVKLQESGPGVLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIW ¶
SGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYN ¶
YFDAWGCCTTVTVSS ¶
- y un dominio VL de secuencia
- QAVVIQESALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDHCFTGLI ¶
GGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVI ¶
15 GGGTRLTVLG; ¶
- o bien un dominio VH de secuencia
- HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLG ¶
VIWSSGGTAYNTALISRFITSRDNSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGS ¶
YPYNYFDAWGCCTTVTVSS ¶
- y un dominio VL de secuencia
- QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQKPGQCPRGLI ¶
20 GGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAPQPEDEAEYFCALWYSDHWVI GGGTKLTVLG. ¶
2. Anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, que comprende una cualquiera de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, y que comprende además SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.
3. Anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, en el que el segundo sitio de unión a antígeno es un scFv C825 y comprende las secuencias
- HVKLQESGPGVLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGTA
YNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGCCTTVT
25 VSS, y
QAVVIQESALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPG
VPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG.
4. Anticuerpo biespecífico según la reivindicación 1, en el que el segundo sitio de unión a antígeno es un scFv C825 humanizado, y comprende las secuencias

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTLDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSSGGGT
 AYN TALISRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSPYNYFDAWGCGLV
 TVSS, y

QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPP
 GVPARFSGSLLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG.

5. Anticuerpo biespecífico según la reivindicación 3 ó 4, en el que el scFv C825 se liga al extremo C-terminal de la cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina o se liga al extremo C-terminal de la cadena ligera de la molécula de inmunoglobulina.
6. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende las secuencias que codifican para el anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 6.
8. Célula huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 7.
9. Método de producción de un anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo el método:
 cultivar la célula huésped según la reivindicación 8 en un medio de cultivo en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo biespecífico, y
 separar el anticuerpo biespecífico del medio de cultivo.
10. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o diagnóstico de cáncer.
12. Anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento de un cáncer positivo para A33 en un sujeto, en el que el tratamiento comprende
 (a) administrar el anticuerpo biespecífico según la reivindicación 5 a un sujeto en condiciones y durante un tiempo suficientes para que el anticuerpo biespecífico se ubique en uno o más tumores que expresan el antígeno A33, seguido de
 (b) administrar un agente de aclaramiento al sujeto, en el que el agente de aclaramiento retira anticuerpo biespecífico no unido, seguido de
 (c) administrar DOTA-Bn radiomarcado al sujeto,
 en el que las etapas (a)-(c) se realizan durante 1, 2, 3, 4, 5 o más ciclos.
13. Anticuerpo biespecífico para su uso en el diagnóstico de un cáncer positivo para A33 en un sujeto, en el que el diagnóstico comprende
 (a) administrar el anticuerpo biespecífico según la reivindicación 5 a un sujeto en condiciones y durante un tiempo suficientes para que el anticuerpo biespecífico se ubique en uno o más tumores que expresan el antígeno A33, seguido de
 (b) administrar un agente de aclaramiento al sujeto, en el que el agente de aclaramiento retira anticuerpo biespecífico no unido, seguido de
 (c) administrar DOTA-Bn radiomarcado al sujeto,
 en el que las etapas (a)-(c) se realizan durante 1 ciclo.

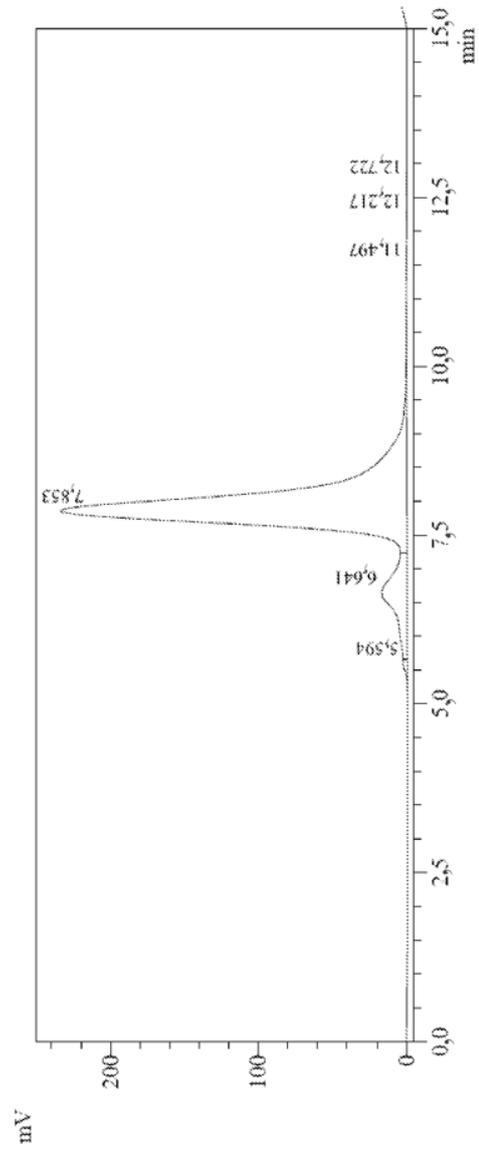
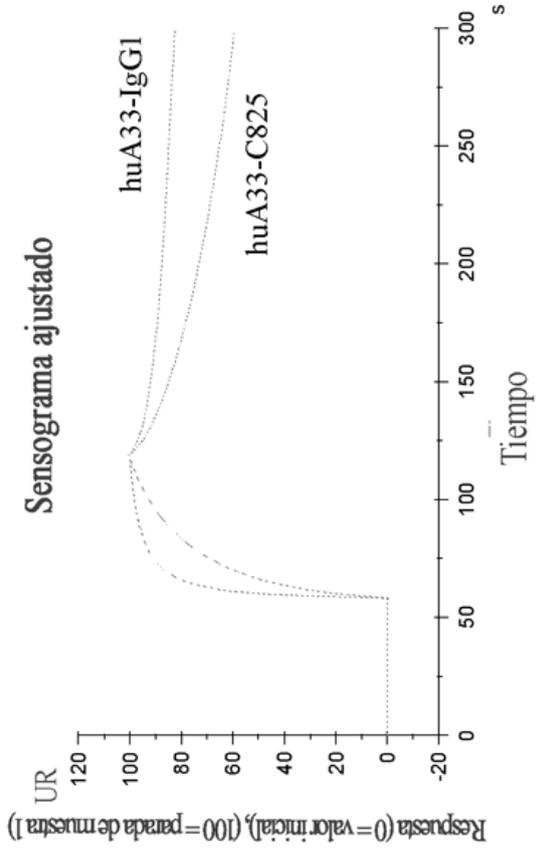
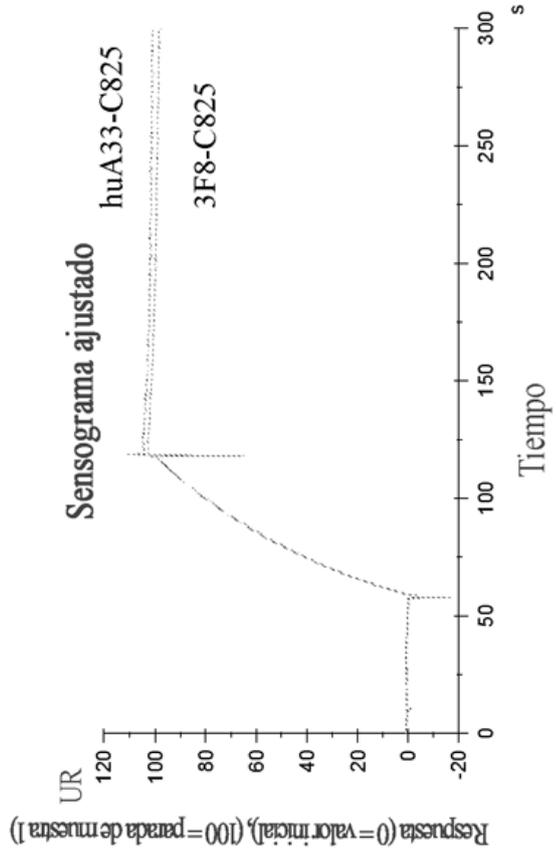


Figura 1



A



B

Figura 2

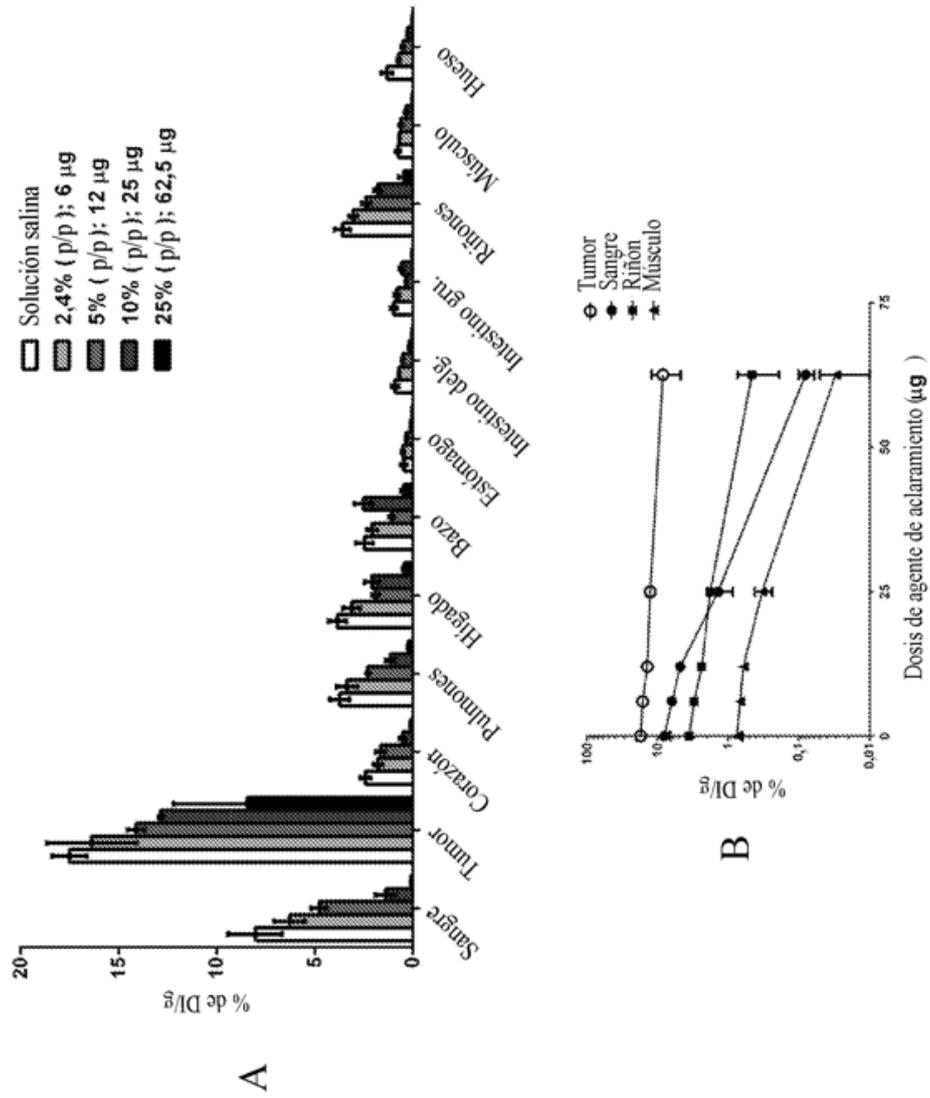


Figura 3A y 3B

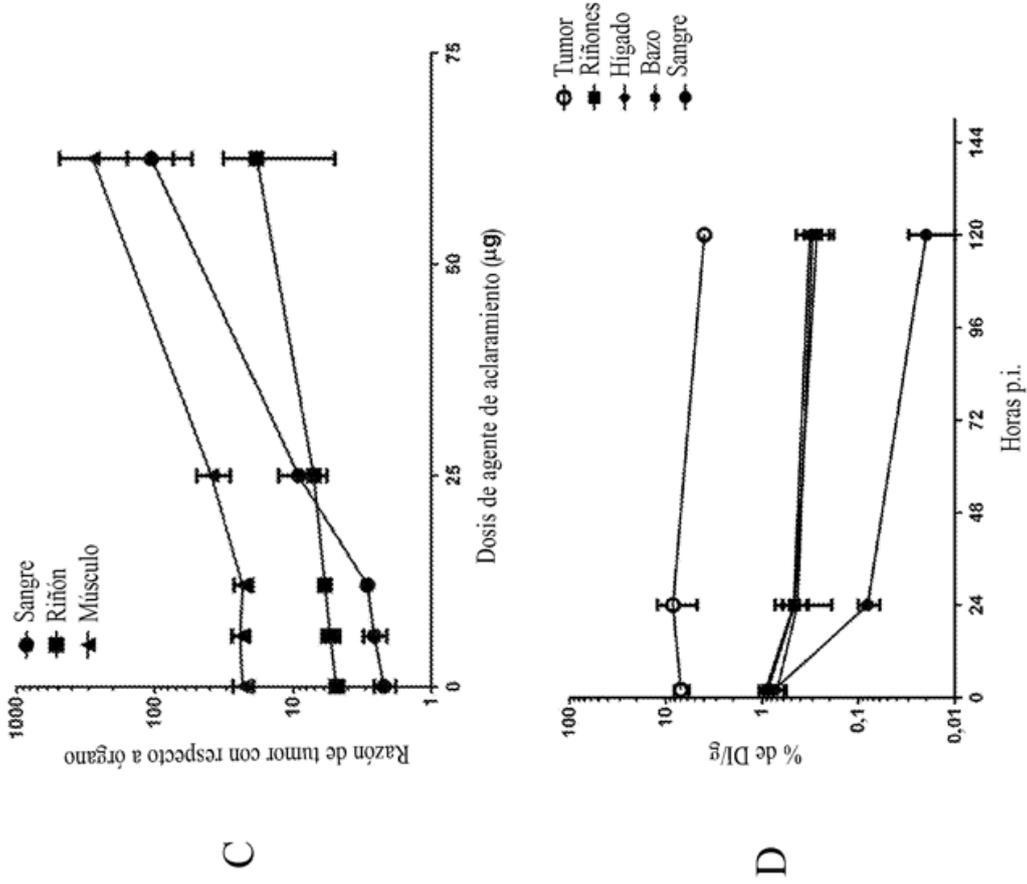


Figura 3C y 3D

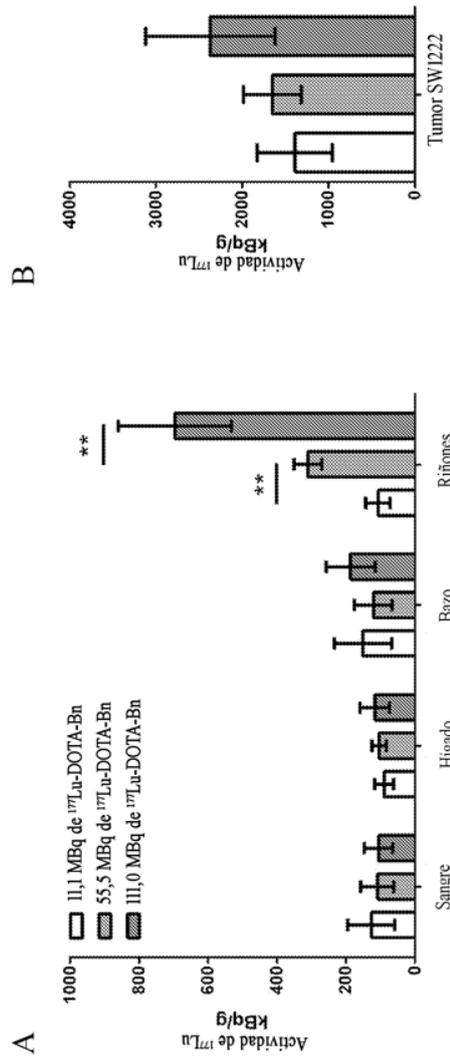


Figura 4A y 4B

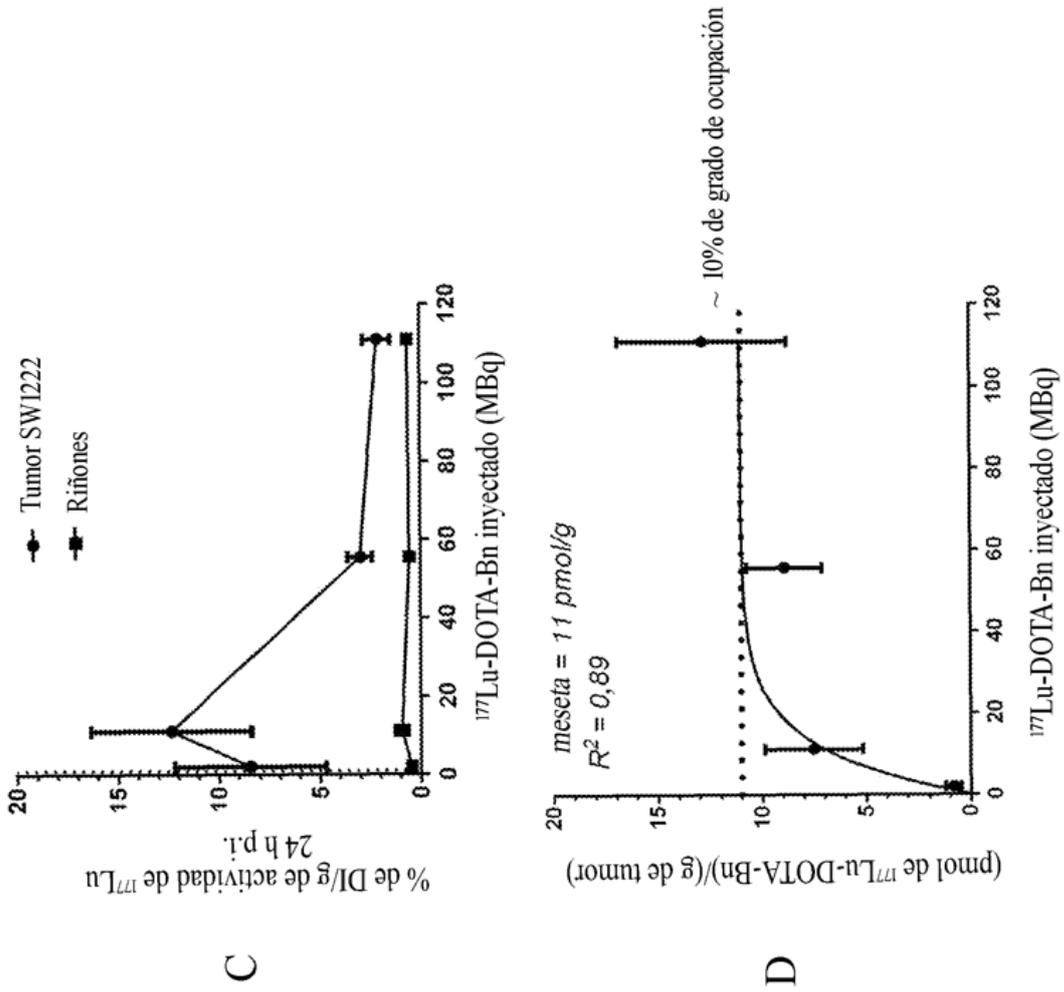


Figura 4C y 4D

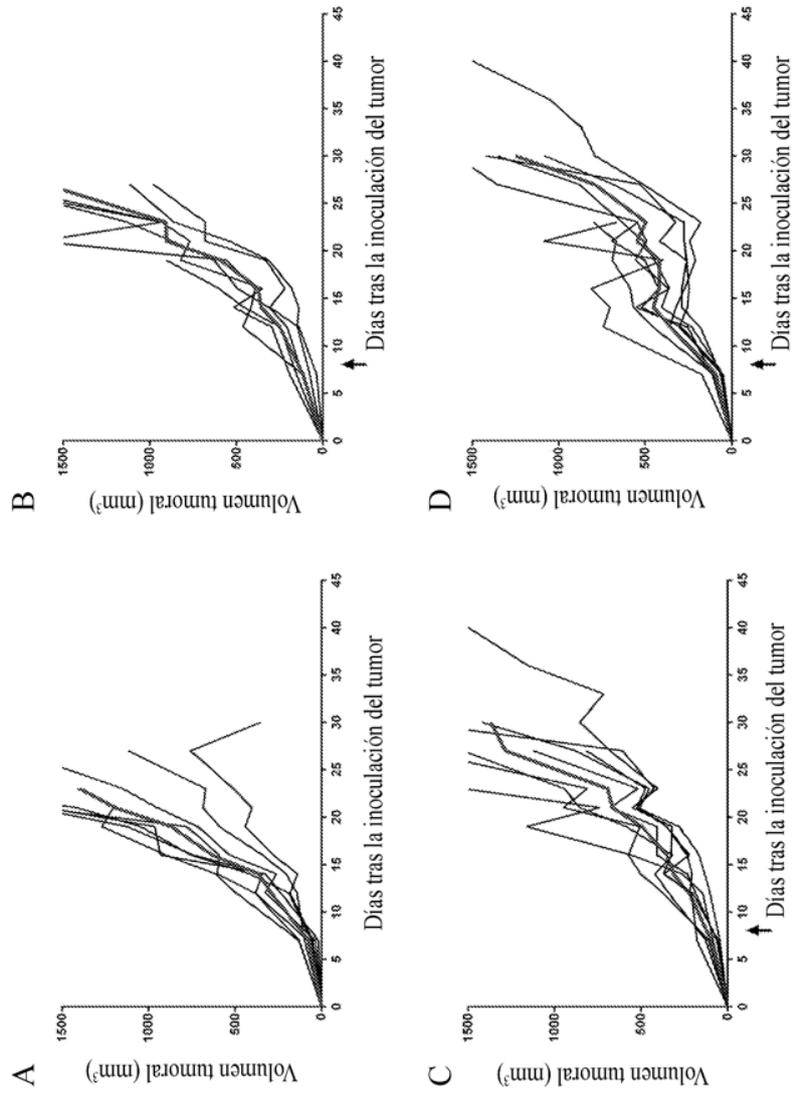


Figura 5

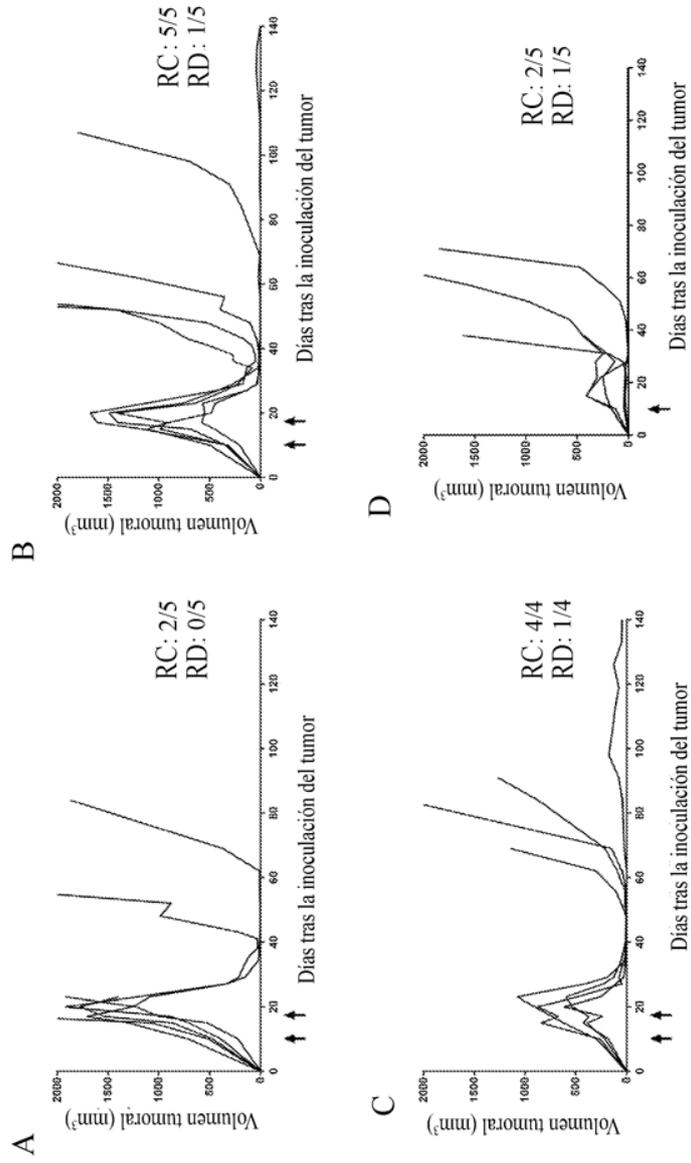


Figura 6

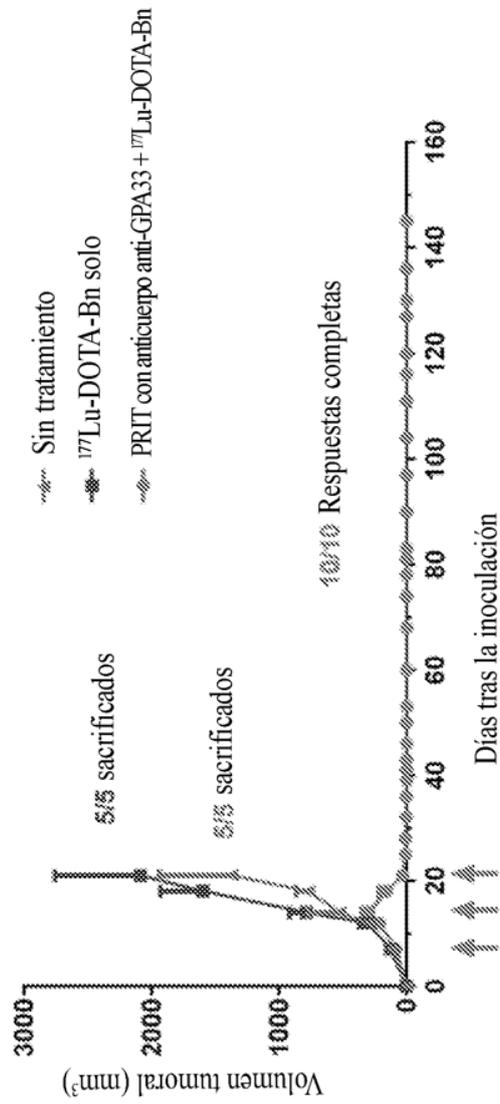


Figura 7

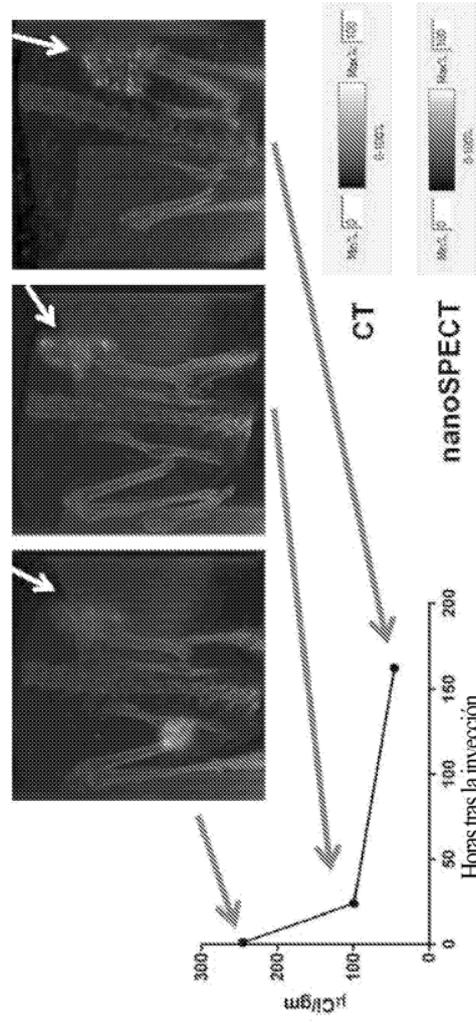


Figura 8