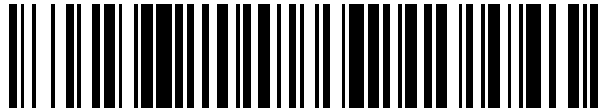


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 343**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2005 E 05761845 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1753783**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD3 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

03.06.2004 US 576483 P
10.09.2004 US 609153 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.01.2015

73 Titular/es:

NOVIMMUNE SA (100.0%)
14 ch. Des Aulx, Plan-Les-Ouates
1228 Geneva, CH

72 Inventor/es:

MACH, BERNARD;
DEAN, YANN;
KOSCO-VILBOIS, MARIE;
ELSON, GREG CHRISTOPHER ANDREW;
FISCHER, NICOLAS y
LEGER, OLIVIER

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 526 343 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 anti-CD3 y métodos de uso de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere en general a anticuerpos anti-CD3 completamente humanos así como a métodos para el uso de los mismos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sistema inmunitario del cuerpo sirve como defensa frente a una variedad de estados, incluyendo, por ejemplo, lesión, infección y neoplasia, y está mediado por dos sistemas separados pero interrelacionados, los sistemas inmunitarios celular y humoral. En términos generales, el sistema humoral está mediado por productos solubles, denominados anticuerpos o inmunoglobulinas, que tienen la capacidad para combinarse con y neutralizar productos reconocidos por el sistema como foráneos para el cuerpo. En cambio, el sistema inmunitario celular implica la movilización de determinadas células, denominadas células T que sirven para una variedad de papeles terapéuticos.

El sistema inmunitario de tanto seres humanos como animales incluye dos clases principales de linfocitos: las células derivadas del timo (células T) y las células derivadas de la médula ósea (células B). Las células T maduras surgen del timo y circulan entre los tejidos, los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo. Las células T presentan especificidad inmunológica y están implicadas directamente en respuestas inmunitarias mediadas por células (tales como rechazo de injerto). Las células T actúan contra o en respuesta a una variedad de estructuras foráneas (antígenos). En muchos casos estos antígenos foráneos se expresan sobre células huésped como resultado de infección. Sin embargo, los antígenos foráneos también pueden proceder del huésped habiéndose alterado por neoplasia o infección. Aunque las células T no secretan por sí mismas anticuerpos, se requieren habitualmente para la secreción de anticuerpos por la segunda clase de linfocitos, las células B.

Hay diversos subconjuntos de células T, que se definen generalmente por determinantes antigénicos que se encuentran en sus superficies celulares, así como actividad funcional y reconocimiento de antígenos foráneos. Algunos subconjuntos de células T, tales como células CD8⁺, son células citolíticas/supresoras que desempeñan una función de regulación en el sistema inmunitario, mientras que otros, tales como células CD4⁺, sirven para promover respuestas inflamatorias y humorales.

Pueden estimularse linfocitos T periféricos humanos para que experimenten mitosis mediante una variedad de agentes incluyendo antígenos foráneos, anticuerpos monoclonales y lectinas tales como fitohemaglutinina y concanavalina A. Aunque la activación se produce presumiblemente mediante unión de los mitógenos a sitios específicos en membranas celulares, la naturaleza de estos receptores, y su mecanismo de activación, no está completamente aclarado. La inducción de proliferación es sólo una indicación de activación de células T. Otras indicaciones de activación, definidas como alteraciones en el estado basal o de reposo de la célula, incluyen aumento de la producción de linfocinas y actividad celular citotóxica.

La activación de células T es un fenómeno complejo que depende de la participación de una variedad de moléculas de superficie celular expresadas en la población de células T que responde. Por ejemplo, el receptor de células T específico de antígeno (TcR) está compuesto por un heterodímero unido por disulfuro, que contiene dos cadenas de glicoproteína de membrana integrales, distribuidas clonalmente, alfa y beta (α y β), o gamma y delta (γ y δ), no asociadas covalentemente con un complejo proteínas invariantes de bajo peso molecular, designado comúnmente como CD3 (denominado una vez T3).

Las cadenas alfa y beta de TcR determinan las especificidades de antígeno. Las estructuras de CD3 representan moléculas accesorias que son los elementos transducción de señales de activación iniciadas tras la unión del TcR alfa beta (TcR $\alpha\beta$) a su ligando. Hay tanto regiones constantes de las cadenas de glicoproteína de TcR como regiones variables (polimorfismos). Las regiones variables de TcR polimórficos definen subconjuntos de células T, con especificidades distintas. A diferencia de anticuerpos que reconocen fragmentos completos o más pequeños de proteínas foráneas como antígenos, el complejo de TcR interacciona con sólo péptidos pequeños del antígeno, que deben presentarse en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estas proteínas del CMH representan otro conjunto altamente polimórfico de moléculas dispersadas aleatoriamente por todas las especies. Por tanto, la activación requiere habitualmente la interacción tripartita del TcR y el antígeno peptídico foráneo unido a las proteínas del CMH principales.

60 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos específicamente contra CD3. Los anticuerpos de la invención comprenden las secuencias de CDR y mutaciones de cadenas pesadas definidas en la reivindicación 1. Los anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo incluyen 28F11, 27H5, 23F10 y 15C3 descritos en el presente documento. Los anticuerpos se denominan respectivamente en el presente

documento anticuerpos frente a huCD3. El anticuerpo frente a huCD3 tiene una o más de las siguientes características: el anticuerpo se une a células positivas para CD3 (CD3+) pero no a células negativas para CD3 (CD3-); el anticuerpo frente a huCD3 induce modulación antigénica que implica alteración (por ejemplo, disminución) de la actividad o el nivel de expresión en la superficie celular de CD3 o el receptor de células T (TcR); el anticuerpo frente a huCD3 inhibe la unión del anticuerpo monoclonal murino anti-OKT3 humano a linfocitos T; o el anticuerpo frente a huCD3 se une a un epítipo de CD3 que incluye total o parcialmente la secuencia de aminoácidos EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 21). Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención compiten con el anticuerpo murino OKT3 anti-CD3 por la unión a CD3, y la exposición al anticuerpo frente a huCD3 elimina o enmascara CD3 y/o TcR sin afectar a la expresión en la superficie celular de CD2, CD4 o CD8. El enmascaramiento de CD3 y/o TcR da como resultado pérdida o reducción de activación de células T, que es deseable en enfermedades autoinmunitarias en las que se produce activación no controlada de células T. La regulación por disminución de CD3 da como resultado un efecto prolongado de activación de células T reducida, por ejemplo, durante un periodo de al menos varios meses, en comparación con la supresión transitoria que se observa cuando se usa un agente inmunosupresor tradicional, por ejemplo, ciclosporina.

Modulación antigénica se refiere a la redistribución y eliminación del complejo CD3-receptor de células T sobre la superficie de una célula, por ejemplo, un linfocito. La disminución en el nivel de actividad o expresión en la superficie celular del TcR en la célula quiere decir que la cantidad o función del TcR se reduce. La modulación del nivel de actividad o expresión en la superficie celular de CD3 significa que la cantidad de CD3 en la superficie celular o la función de CD3 se altera, por ejemplo, se reduce. La cantidad de CD3 o el TcR expresado en la membrana plasmática de la célula se reduce, por ejemplo, mediante la internalización de CD3 o el TcR tras el contacto de la célula con el anticuerpo frente a huCD3. Alternativamente, tras el contacto de una célula con el anticuerpo frente a huCD3, se enmascara CD3 o el TcR.

La inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal murino anti-OKT3 humano a un linfocito T se define como una disminución en la capacidad del anticuerpo murino frente a OKT3 para formar un complejo con CD3 en la superficie celular de un linfocito T.

Un anticuerpo frente a huCD3 contiene preferiblemente una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 6, 10 ó 22 y una cadena variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 16-20 ó 25-26.

Un anticuerpo frente a huCD3 de la invención también presenta preferiblemente uno o más (es decir, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más) de las siguientes características;

el anticuerpo incluye la secuencia de aminoácidos VTVSS (SEQ ID NO: 64) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3, en el que la posición está en una región variable C-terminal con respecto a la región CDR3; el anticuerpo incluye la secuencia de aminoácidos GTLVTVSS (SEQ ID NO: 65) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3, en el que la posición está en una región variable C-terminal con respecto a la región CDR3; el anticuerpo incluye la secuencia de aminoácidos WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3, en el que la posición está en una región variable C-terminal con respecto a la región CDR3; el anticuerpo se une a un epítipo que incluye total o parcialmente la secuencia de aminoácidos EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 67); y el anticuerpo incluye una mutación adicional en la cadena pesada en un residuo de aminoácido en la posición 265 ó 297 o combinaciones de las mismas, y en el que la liberación de citocinas a partir de una célula T en presencia de dicho anticuerpo se reduce en comparación con la liberación de citocinas a partir de una célula T en presencia de un anticuerpo que no incluye una mutación adicional en la cadena pesada en la posición 234, 235, 265 ó 297 o combinaciones de las mismas. La numeración de los residuos de la cadena pesada descritos en el presente documento es la del índice EU (véase Kabat *et al.*, "Proteins of Immunological Interest", US Dept. of Health & Human Services (1983)), tal como se muestra, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.624.821 y 5.648.260.

El anticuerpo frente a huCD3 contiene una mutación de aminoácido tal como se define en la reivindicación 1. La mutación está en la región constante. La mutación da como resultado un anticuerpo que tiene una función efectora alterada. Una función efectora de un anticuerpo se altera alterando, es decir, potenciando o reduciendo, la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor de Fc o un componente del complemento. Mediante la alteración de una función efectora de un anticuerpo, es posible controlar diversos aspectos de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmunitario. La mutación da como resultado un anticuerpo que puede reducir la liberación de citocinas a partir de una célula T. La mutación está en la cadena pesada en el residuo de aminoácido 234, 235, también pueden estar presentes mutaciones en las posiciones 265 ó 297 o combinaciones de las mismas. La mutación da como resultado un residuo de alanina en la posición 234 y un residuo de glutamato en la posición 235. También pueden estar presentes mutaciones que dan como resultado un residuo de alanina en la posición 265 ó 297 o combinaciones de las mismas. El término "citocina" se refiere a todas las citocinas humanas conocidas dentro de la técnica que se unen a receptores extracelulares expresados sobre la superficie celular y de ese modo modulan la función celular, incluyendo pero sin limitarse a IL-2, IFN-gamma, TNF-a, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

La liberación de citocinas puede conducir a un estado tóxico conocido como síndrome de liberación de citocinas (SLC), una complicación clínica común que se produce, por ejemplo, con el uso de un anticuerpo anti-células T tal como ATG (anti-globulina de timocitos) y OKT3 (un anticuerpo murino anti-CD3 humano). Este síndrome se caracteriza por la liberación excesiva de citocinas tales como TNF, IFN-gamma e IL-2 a la circulación. El SLC se produce como resultado de la unión simultánea de los anticuerpos a CD3 (por medio de la región variable del anticuerpo) y los receptores de Fc y/o receptores del complemento (por medio de la región constante del anticuerpo) sobre otras células, activando de ese modo las células T para que liberen citocinas que producen una respuesta inflamatoria sistémica caracterizada por hipotensión, pirexia y escalofríos intensos. Los síntomas del SLC incluyen fiebre, escalofríos moderados, náuseas, vómitos, hipotensión y disnea. Por tanto, el anticuerpo frente a huCD3 de la invención contiene una o más mutaciones que impiden la liberación mediada por la región constante de cadena pesada de una o más citocinas *in vivo*.

Los anticuerpos frente a CD3 completamente humanos de la invención incluyen una mutación L²³⁴, L²³⁵ → A²³⁴ E²³⁵ en la región Fc, de manera que la liberación de citocinas tras la exposición al anticuerpo frente a huCD3 se reduce significativamente o se elimina (véanse por ejemplo, las figuras 11A, 11B). Tal como se describe más adelante en el ejemplo 4, la mutación L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴ E²³⁵ en la región Fc de los anticuerpos frente a huCD3 de la invención reduce o elimina la liberación de citocinas cuando los anticuerpos frente a huCD3 se exponen a leucocitos humanos, mientras que las mutaciones descritas a continuación mantienen una capacidad de liberación de citocinas significativa. Por ejemplo, una reducción significativa en la liberación de citocinas se define comparando la liberación de citocinas tras la exposición al anticuerpo frente a huCD3 que tiene una mutación L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴ E²³⁵ en la región Fc con el nivel de liberación de citocinas tras la exposición a otro anticuerpo anti-CD3 que tiene una o más de las mutaciones descritas a continuación. Otras mutaciones en la región Fc incluyen, por ejemplo, L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴ A²³⁵, L²³⁵ → E²³⁵, N²⁹⁷ → A²⁹⁷ y D²⁶⁵ → A²⁶⁵.

Los anticuerpos frente a huCD3 incluyen preferiblemente una región de entramado 2 (FRW2) que contiene la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 73), los anticuerpos frente a huCD3 de la invención incluyen una región de entramado 3 (FRW3) que contiene la secuencia de aminoácidos RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 74).

Algunos anticuerpos frente a huCD3 incluyen la secuencia de aminoácidos contiguos VTVSS (SEQ ID NO: 64) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3. Por ejemplo, el anticuerpo contiene la secuencia de aminoácidos contiguos GTLVTVSS (SEQ ID NO: 65) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3. Otros anticuerpos frente a huCD3 incluyen la secuencia de aminoácidos contiguos WGRGLTVTVSS (SEQ ID NO: 66) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3. Se muestra el residuo de arginina en SEQ ID NO: 66, por ejemplo, en las secuencias de V_H para el anticuerpo frente a huCD3 28F11 (SEQ ID NO: 2) y el anticuerpo frente a huCD3 23F10 (SEQ ID NO: 6).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos según la reivindicación 1 para su uso como medicamento, por ejemplo para su uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de un síntoma de un trastorno relacionado con la inmunidad administrando un anticuerpo frente a huCD3 a un sujeto. Opcionalmente, al sujeto se le administra además un segundo agente tal como, pero sin limitarse a, compuestos antiinflamatorios o compuestos inmunosupresores. Por ejemplo, a sujetos con diabetes tipo I o diabetes autoinmunitaria latente en el adulto (LADA) también se les administra un segundo agente, tal como, por ejemplo, GLP-1 o un compuesto que deja en reposo células beta (es decir, un compuesto que reduce o inhibe de otra forma la liberación de insulina, tal como compuestos que abren canales de potasio).

Los compuestos adecuados incluyen, pero no se limitan a metotrexato, ciclosporina A (incluyendo, por ejemplo, microemulsión de ciclosporina), tacrolímús, corticosteroides, estatinas, interferón beta, Remicade (infliximab), Enbrel (etanercept) y Humira (adalimumab).

El sujeto padece o está predispuesto a desarrollar un trastorno relacionado con la inmunidad, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

En otro aspecto, la invención proporciona el anticuerpo frente a huCD3 de la invención para tratar o prevenir el rechazo tras trasplante de órgano o tejido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para las regiones ligera variable y pesada variable del el anticuerpo frente a huCD3 28F11. La figura 1A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, y la figura 1B representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1A, en la que las CDR se resaltan con recuadros. La figura 1C representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera, y la figura 1D representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 C, en la que las CDR se indican mediante recuadros.

La figura 2 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para las regiones ligera variable y pesada variable del anticuerpo frente a huCD3 23F10, representando la figura 2A la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, representando la figura 2B la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 2A, representando la figura 2C la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena ligera y representando la figura 2D la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 2C.

La figura 3 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para las regiones ligera variable y pesada variable del anticuerpo frente a huCD3 27H5. La figura 3A representa la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada; la figura 3B representa la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 3A; la figura 3C representa las cinco secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de la cadena ligera para el clon 27H5; la figura 3D representa las cinco secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos mostradas en la figura 3C; y la figura 3E es una alineación de las cinco cadenas ligeras del clon 27H5, en la que un asterisco (*) en la última fila (marcado CLAVE) representa un aminoácido conservado en esa columna; dos puntos (:) en la fila CLAVE representa una mutación conservativa; y un punto (.) en la fila CLAVE representa una mutación semiconservativa.

La figura 4 es una serie de representaciones de la secuencia de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para las regiones ligera variable y pesada variable del anticuerpo frente a huCD3 15C3, representando la figura 4A la secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena pesada, representando la figura 4B la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 4A, representando la figura 4C las dos secuencias de nucleótidos que codifican para la región variable de la cadena ligera para el clon 15C3 y representando la figura 4D las dos secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos mostradas en la figura 4C.

La figura 5 es una alineación que representa las regiones de cadena pesada variable de los anticuerpos frente a huCD3 15C3, 27H5 y 28F11 así como la secuencia de línea germinal DP-50, la secuencia 5-02 de unión a cadena pesada humana y la secuencia 2 de unión a cadena pesada humana. Las regiones CDR se indican para cada secuencia.

La figura 6 es una alineación que representa las regiones variables V_kIII de los anticuerpos frente a huCD3 15C3 (cadena ligera variable 1, es decir, "VL1") y 28F11, así como la secuencia de línea germinal L6, la secuencia 4 de unión a cadena kappa humana y la secuencia 1 de unión a cadena kappa humana. Las regiones CDR se indican para cada secuencia.

La figura 7 es una alineación que representa las regiones variables V_kI de los anticuerpos frente a huCD3 15C3 (cadena ligera variable 2, es decir, "VL2") y 27H5 VL2, así como la secuencia de línea germinal L4/18a, la secuencia 4 de unión a cadena kappa humana y la secuencia 5 de unión a cadena kappa humana. Las regiones CDR se indican para cada secuencia.

La figura 8 es una alineación que representa las regiones variables V_kII del anticuerpo frente a huCD3 27H5 VL1 y DPK22, así como la secuencia 5 de unión a cadena kappa humana. Las regiones CDR se indican para cada secuencia.

La figura 9A es un gráfico que representa la unión del anticuerpo a moléculas CD3 en la superficie de células Jurkat usando una variedad de anticuerpos anti-CD3, incluyendo los anticuerpos frente a huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 y 15C3VL2 de la invención. La figura 9B es un gráfico que representa la capacidad de una variedad de anticuerpos anti-CD3, incluyendo los anticuerpos frente a huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 y 15C3VL2 de la invención, para inhibir la unión del anticuerpo murino anti-CD3 OKT3 a células positivas para CD3. La figura 9C es un gráfico que representa la modulación antigénica de CD3 y TCR a partir de la superficie de células T de sangre periférica humana mediante una variedad de anticuerpos anti-CD3, incluyendo los anticuerpos frente a huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 y 15C3VL2 de la invención. La figura 9D es un gráfico que representa el efecto de una variedad de anticuerpos anti-CD3, incluyendo los anticuerpos frente a huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 y 15C3VL2 de la invención, sobre la proliferación de células T.

La figura 10 es una ilustración que representa el patrón de unión del anticuerpo monoclonal completamente humano 28F11 sobre una matriz peptídica derivada de la secuencia de aminoácidos de la cadena épsilon de CD3.

La figura 11 es una serie de gráficos que representan el nivel de liberación de citocinas tras la exposición a anticuerpo frente a huCD3 28F11 de tipo natural (28F11WT), un anticuerpo frente a huCD3 28F11 mutado que tiene una mutación $L^{234} L^{235} \rightarrow A^{234} A^{235}$ (28F11AA) y un anticuerpo frente a huCD3 28F11 mutado que tiene una mutación $L^{234} L^{235} \rightarrow A^{234} E^{235}$ (28F11AE). La figura 11A representa el nivel de liberación de TNF-alfa tras la exposición a estos anticuerpos, y la figura 11B representa el nivel de liberación de interferón gamma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos contra la cadena épsilon de CD3 (CD3 ϵ). Los anticuerpos se denominan respectivamente en el presente documento anticuerpos frente a huCD3.

CD3 es un complejo de al menos cinco polipéptidos unidos a membrana en linfocitos T maduros que no están asociados covalentemente entre sí ni con el receptor de células T. El complejo CD3 incluye las cadenas gamma, delta, épsilon, zeta y eta (también denominadas subunidades). Se han desarrollado anticuerpos monoclonales no humanos contra algunas de estas cadenas, tal como se muestra a modo de ejemplo por los anticuerpos murinos OKT3, SP34, UCHT1 o 64.1 (véanse por ejemplo, June, *et al.*, J. Immunol. 136:3945-3952 (1986); Yang, *et al.*, J. Immunol. 137:1097-1100 (1986); y Hayward, *et al.*, Immunol. 64:87-92 (1988)).

Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención se produjeron inmunizando dos líneas de ratones transgénicos, los ratones HuMabTM y los ratones KMTM (Medarex, Princeton NJ).

Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención tienen una o más de las siguientes características: el anticuerpo frente a huCD3 se une a células positivas para CD3 (CD3+) pero no a células negativas para CD3 (CD3-); el anticuerpo frente a huCD3 induce modulación antigénica que implica alteraciones de los niveles de expresión en la superficie celular de CD3 y el receptor de células T (TcR); o el anticuerpo frente a huCD3 inhibe la unión del anticuerpo monoclonal murino anti-OKT3 humano a linfocitos T. Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención compiten con el anticuerpo OKT3 murino anti-CD3 por la unión a CD3, y la exposición al anticuerpo frente a huCD3 elimina o enmascara CD3 y/o TcR sin afectar a la expresión en la superficie celular de CD2, CD4 o CD8. El enmascaramiento de CD3 y/o TcR da como resultado pérdida o reducción de activación de células T.

Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención se unen a una CD3 que incluye total o parcialmente los residuos de aminoácido desde la posición 27 hasta la posición 43 de la subunidad épsilon de CD3 humana procesada (es decir, sin la secuencia líder). La secuencia de aminoácidos de la subunidad épsilon de CD3 humana se muestra, por ejemplo, en los n.ºs de registro de GenBank NP_000724; AAA52295; P07766; A32069; CAA27516; y AAH49847. Por ejemplo, el anticuerpo frente a huCD3 se une a un epítipo de CD3 que incluye total o parcialmente la secuencia de aminoácidos de EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 67). Un anticuerpo monoclonal frente a huCD3 a modo de ejemplo que se une a este epítipo es el anticuerpo 28F11 descrito en el presente documento. El anticuerpo 28F11 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 2) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada a continuación en SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 3 (figuras 1A-1D).

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tal como se definen por Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 se resaltan con recuadros a continuación (véanse también las figuras 1B y 1D y las figuras 5 y 6). (Véanse Chothia, C, *et al.*, Nature 342:877-883 (1989); Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 28F11 tienen las siguientes secuencias: GYGMH (SEQ ID NO: 27) VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 28) y QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 29). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 28F11 tienen las siguientes secuencias: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30) DASNRAT (SEQ ID NO: 31) y QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32).

>secuencia de nucleótidos de VH de 28F11: (SEQ ID NO: 1)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATAC
TATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT
GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAC
AAATGGGCTACTGGCACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

>secuencia de aminoácidos de VH de 28F11: (SEQ ID NO: 2)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGPKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKKY
YVDSVKGGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVSS

>secuencia de nucleótidos de VL de 28F11: (SEQ ID NO: 3)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC
 CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA
 GCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA

GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTT
 TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

>secuencia de aminoácidos de VL de 28F11: (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC[RASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYC[QQRSNWPPLT]FGGGTKVEIK

5 El anticuerpo 23F10 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 6) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada a continuación en SEQ ID NO: 5, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 8) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 7.

10 Los aminoácidos que abarcan la CDR tal como se definen por Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 se resaltan con recuadros a continuación (véanse también las figuras 2B, 2D). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 23F10 tienen las siguientes secuencias: GYGMH (SEQ ID NO: 27) VIWYDGSKKYVDSVKG (SEQ ID NO: 28) y QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 29). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 23F10 tienen las siguientes secuencias: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30) DASNRAT (SEQ ID NO: 31) y QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32).

>secuencia de nucleótidos de VH de 23F10: (SEQ ID NO: 5)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
 CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATAC
 TATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCT
 GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAC
 AAATGGGCTACTGGCACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

>secuencia de aminoácidos de VH de 23F10: (SEQ ID NO: 6)

QVQLVQSGGGVVSQGRSLRLSCAASGFKFS[GYGMH]WVRQAPGKGLEWVAVI[IWYDGSKKY]
 20 [YVDSVKG]RFTISRDNKNTLYLQMNSLRGEDTAVYYCAR[QMGYWHFDL]WGRGTLVTVSS

>secuencia de nucleótidos de VL de 23F10: (SEQ ID NO: 7)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC
 CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA
 GCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA

GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTT
 TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

>secuencia de aminoácidos de VL de 23F10: (SEQ ID NO: 8)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC[RASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
 25 ARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYC[QQRSNWPPLT]FGGGTKVEIK

30 El anticuerpo 27H5 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 10) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada a continuación en SEQ ID NO: 9, y una región variable de cadena ligera seleccionada de las secuencias de aminoácidos mostradas a continuación en SEQ ID NO: 16-20 y codificadas por las secuencias de ácido nucleico mostradas en SEQ ID NO: 11-15. Tal como se describe en el presente documento en el ejemplo 2, un único hibridoma clonal derivado de los ratones transgénicos HuMAb® puede producir múltiples cadenas ligeras para una única cadena pesada. Cada combinación de cadenas pesadas y ligeras producidas se somete a prueba para determinar el funcionamiento óptimo, tal como se describe en el presente documento en el ejemplo 2.

35 Los aminoácidos que abarcan la CDR tal como se definen por Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 se resaltan

con recuadros a continuación (véanse las figuras 3B, 3D, 5 y 7-8). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 27H5 tienen las siguientes secuencias: SYGMH (SEQ ID NO: 33) IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO: 34) y GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 27H5 tienen las siguientes secuencias: RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 36); GASSRAT (SEQ ID NO: 37); QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 38); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); YASSLQS (SEQ ID NO: 40); QQYYSTLT (SEQ ID NO: 41); DASSLGS (SEQ ID NO: 42); y WASQGISSYLA (SEQ ID NO: 43).

>secuencia de nucleótidos de VH de 27H5: (SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGAAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTATGATGGAAGTAAAAAAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT
GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAG
GAACTGGGTACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

>secuencia de aminoácidos de VH de 27H5: (SEQ ID NO: 10)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFR SYGMH WVRQAPGKGLEWVA IIWYDGSKKN
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR GTGYNWFDP WGQGLVTVSS

>secuencia de nucleótidos de VL1 de 27H5: (SEQ ID NO: 11)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCACGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGA
AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATC
CCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT
GGACCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCT
TCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA

>secuencia de nucleótidos de VL2 de 27H5: (SEQ ID NO: 12)

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
TCAAGGTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>secuencia de nucleótidos de VL3 de 27H5: (SEQ ID NO: 13)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAGTGGGGTCCCA
TCAAGGTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>secuencia de nucleótidos de VL4 de 27H5: (SEQ ID NO: 14)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTATTAGCCTGGTATCAGCAAAAAC
CAGCAAAAGCCCTAAGCTCTTCATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
TCAAGGTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>secuencia de nucleótidos de VL5 de 27H5: (SEQ ID NO: 15)

GACATCGAGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAAC
 CAGCAAAAGCCCCTAAGCTCTTCATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTAGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
 GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>secuencia de aminoácidos de VL1 de 27H5: (SEQ ID NO: 16)

EIVLTQSPRTLSPGERATLSQRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLLDPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIK

5

>secuencia de aminoácidos de VL2 de 27H5: (SEQ ID NO: 17)

DILMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQOKPGKAPKLLIYYASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

>secuencia de aminoácidos de VL3 de 27H5: (SEQ ID NO: 18)

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQOKPGKAPKLLIYDASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISRLLDPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

10

>secuencia de aminoácidos de VL4 de 27H5: (SEQ ID NO: 19)

DIQMTQSPFSLASVGDRTITCRASQGISSSYLAWYQOKPAKAPKLFIIYYASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

15

>secuencia de aminoácidos de VL5 de 27H5: (SEQ ID NO: 20)

DIEMTQSPFSLASVGDRTITCRASQGISSSYLAWYQOKPAKAPKLFIIYYASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

El anticuerpo 15C3 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 22) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada a continuación en SEQ ID NO: 21, y una región variable de cadena ligera seleccionada de las secuencias de aminoácidos mostradas a continuación en SEQ ID NO: 25-26 y codificada por las secuencias de ácido nucleico mostradas en SEQ ID NO: 23-24. Tal como se describe en el presente documento en el ejemplo 2, un único hibridoma clonal derivado de los ratones transgénicos HuMAb® puede producir múltiples cadenas ligeras para una única cadena pesada. Cada combinación de cadenas pesadas y ligeras producidas se somete a prueba para determinar el funcionamiento óptimo, tal como se describe en el presente documento en el ejemplo 2.

Los aminoácidos que abarcan la CDR tal como se definen por Chothia *et al.* 1989, E.A. Kabat *et al.*, 1991 se resaltan con recuadros a continuación (véanse las figuras 4B, 4D y 5-7). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 15C3 tienen las siguientes secuencias: SYGMH (SEQ ID NO: 33) AIWYNGRKQDYADSVKG (SEQ ID NO: 44) y GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 15C3 tienen las siguientes secuencias: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30); DASNRAT (SEQ ID NO: 31); QQRSNWPWT (SEQ ID NO: 45); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); DASSLES (SEQ ID NO: 46); QQFNSTPIT (SEQ ID NO: 47).

>secuencia de nucleótidos de VH de 15C3: (SEQ ID NO: 21)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCCGGGAGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
 CTCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGCTATATGGTATAATGGAAGAAAACAAGAC
 TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT
 GTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGGG
 GAACTGGGTACAATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

35

>secuencia de aminoácidos de VH de 15C3: (SEQ ID NO: 22)

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIWYNGRKQD
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGLTVTVSS

>secuencia de nucleótidos de VL1 de 15C3: (SEQ ID NO: 23)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC
 CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA
 GCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA
 GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACTGGCCGTGGACGTTTCG
 5 GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA

>secuencia de nucleótidos de VL2 de 15C3: (SEQ ID NO: 24)

GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTATGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
 CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCTATCACCTTCG
 5 GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAA

>secuencia de aminoácidos de VL1 de 15C3: (SEQ ID NO: 25)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPWFYFGQGTKVEIK

10 >secuencia de aminoácidos de VL2 de 15C3: (SEQ ID NO: 26)

AIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSALAWYQOKPGKAPKLLIYDASSLESQVGP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIK

Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención también incluyen anticuerpos que incluyen una secuencia de
 15 aminoácidos variable de cadena pesada que es idéntica al menos al 90%, el 92%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o
 más a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 6, 10 ó 22 y/o una secuencia aminoácidos variable de cadena
 ligera que es idéntica al menos al 90%, el 92%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o más a la secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 16-20 ó 25-26.

Alternativamente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que se une al mismo epítopo que 28F11, 27H5, 23F10
 20 o 15C3.

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención
 tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que el
 contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el
 25 singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular,
 biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en el presente documento
 son las que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para ADN
 recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo tisular y transformación (por ejemplo, electroporación,
 lipofección). Se realizan técnicas de purificación y reacciones enzimáticas según las especificaciones del fabricante
 30 o tal como se llevan a cabo en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y los
 procedimientos anteriores se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y
 tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y se comentan a lo
 largo de 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)). Las nomenclaturas
 35 utilizadas en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica
 de síntesis y química médica y farmacéutica descritos en el presente documento son aquellos bien conocidos y
 comúnmente usados en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos,
 preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

40 Tal como se utiliza según la presente divulgación debe entenderse que los siguientes términos, a menos que se
 indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y
 partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contiene un sitio
 45 de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Tales anticuerpos incluyen,
 pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos F_{ab}, F_{ab'} y F_{(ab')₂}, y una
 biblioteca de expresión de F_{ab}. Por "se une específicamente" o "inmunorreacciona con" quiere decirse que el

anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona (es decir, se une) con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ($K_d > 10^{-6}$) con otros polipéptidos.

Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada una para una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxilo-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase generalmente, *Fundamental Immunology* cap. 7 (Paul, W., ea., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal" (AcM) o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico de cadena ligera único y un producto génico de cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los AcM contienen un sitio de unión a antígeno que puede inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por el mismo.

En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas a partir de seres humanos se refieren a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Determinadas clases también tienen subclases, tales como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

El término "sitio de unión a antígeno", o "parte de unión" se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígeno está formado por residuos de aminoácido de las regiones variables ("V") N-terminales de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras, denominados "regiones hipervariables", se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones de entramado", o "FR". Por tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas unas con respecto a las otras en el espacio tridimensional formando una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesadas y ligeras se denominan "regiones determinantes de complementariedad", o "CDR". La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv o un receptor de células T. El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de interacciones de unión inmunológica puede expresarse en cuanto a la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d menor representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se cuantifican usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos supone medir las velocidades de formación y disociación del complejo de sitio de unión a antígeno/antígeno, en el que tales velocidades dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por tanto, tanto la "constante de asociación" (K_{on}) como la "constante de disociación" (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361:186-87 (1993)). La razón de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d (véase, generalmente, Davies *et al.* (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente

invención se une específicamente a un epítipo de CD3 cuando la constante de unión en equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$ y lo más preferiblemente de $\leq 100 \text{ pM}$ a aproximadamente 1 pM , tal como se mide mediante ensayos tales como ensayos de unión a radioligando o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin experimentación excesiva, si un anticuerpo monoclonal humano tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal humano de la invención (por ejemplo, anticuerpo monoclonal 28F11, 27H5, 23F10 o 15C3) determinando si el primero impide que el último se una a un polipéptido de antígeno de CD3. Si el anticuerpo monoclonal humano que está sometándose a prueba compite con un anticuerpo monoclonal humano de la invención, tal como se muestra por una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal humano de la invención, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o a uno estrechamente relacionado. Otra manera de determinar si un anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal humano de la invención es incubar previamente el anticuerpo monoclonal humano de la invención con el polipéptido de antígeno de CD3 con el que normalmente es reactivo, y entonces añadir el anticuerpo monoclonal humano que está someténdose a prueba para determinar si el anticuerpo monoclonal humano que está someténdose a prueba se inhibe en su capacidad para unirse al polipéptido de antígeno de CD3. Si el anticuerpo monoclonal humano que está someténdose a prueba se inhibe entonces, con toda probabilidad, tiene la misma, o funcionalmente equivalente, especificidad epitópica que el anticuerpo monoclonal de la invención.

Diversos procedimientos conocidos en la técnica se usan para la producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína tal como una proteína CD3, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de la misma (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en las que toda la secuencia tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluyendo las CDR, surge de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos", o "anticuerpos completamente humanos" en el presente documento. Se preparan anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, usando los procedimientos descritos a continuación en el ejemplo 1. También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando la técnica de trioma; la técnica de hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, *et al.*, 1983 *Immunol Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, *et al.*, 1985 En: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse usando hibridomas humanos (véase Cote, *et al.*, 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, *et al.*, 1985 En: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

Los anticuerpos se purifican mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción de IgG de suero inmunitario. Posterior o alternativamente, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo del mismo, puede inmovilizarse sobre una columna para purificar el anticuerpo específico inmunitario mediante cromatografía de inmovilidad. La purificación de inmunoglobulinas se comenta, por ejemplo, por D. Wilkinson (*The Scientist*, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia PA, vol. 14, n.º 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

Es deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad. Por ejemplo, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) aumentadas (véanse Caron *et al.*, *J. Exp Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para que tenga regiones Fc dobles y de ese modo puede tener capacidades de lisis del complemento y de CCDA potenciadas (véase Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989)).

La invención también incluye fragmentos frente a huCD3 F_v, F_{ab}, F_{ab'} y F_{(ab')₂}, anticuerpos frente a huCD3 de cadena sencilla, anticuerpos frente a huCD3 biespecíficos y anticuerpos frente a huCD3 heteroconjugados.

Anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para CD3. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína o un receptor o una subunidad de receptor de superficie celular.

En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen un posible mezcla de diez moléculas de anticuerpo

diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se lleva a cabo habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

5 Pueden fusionarse dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que
10 contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

15 Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivo celular recombinante. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido
20 pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) sobre la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). En la bibliografía se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos
30 usando enlace químico. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditiolos vecinos e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB vuelve a convertirse entonces en el Fab' -tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

40 Adicionalmente, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab' a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado $F(ab')_2$. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado pudo unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y entonces volvieron a oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un ligador que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

65 Anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuáles se origina en el antígeno proteico de la invención. Alternativamente, un brazo anti-antigénico de una molécula de

- 5 inmunoglobulina puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el antígeno particular. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos presentan un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno proteico descrito en el presente documento y se une además a factor tisular (TF).
- 10 Anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que tales anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente estadounidense n.º 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace de tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los dados a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.676.980.
- 15 La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).
- 20 Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.
- 25 Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditilo)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentiainapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo (véase el documento WO94/11026).
- 30 Los expertos habituales en la técnica reconocerán que puede acoplarse una gran variedad de posibles restos a los anticuerpos resultantes o a otras moléculas de la invención (véanse, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, Nueva York, (1989), cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia).
- 35 El acoplamiento se realiza mediante cualquier reacción química que una las dos moléculas siempre que el anticuerpo y el otro resto conserven sus actividades respectivas. Esta unión puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. Sin embargo, la unión preferida es la unión covalente. La unión covalente se realiza o bien mediante condensación directa de cadenas laterales existentes o bien mediante la incorporación de moléculas externas que forman puentes. Muchos agentes de unión bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas de proteína, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Este listado no pretende ser exhaustivo de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino que, más bien, muestra a modo de ejemplo los agentes de acoplamiento más comunes (véanse Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); y Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). Se describen ligadores preferidos en la bibliografía (véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. *et al.*, Cancer Res. 44:201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también, la patente estadounidense n.º 5.030.719, que describe el uso de derivado de hidrazida de acetilo halogenado acoplado con un anticuerpo mediante un ligador oligopeptídico. Los ligadores particularmente preferidos incluyen: (i) EDC clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida; (ii) SMPT (4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditilo)-tolueno (Pierce Chem. Co., cat. (21558G)); (iii) SPDP (6-[3-(2-piridilditilo)propionamido]hexanoato de succinimidilo (Pierce Chem. Co., n.º de cat. 21651G); (iv) Sulfo-LCSPDP (6-[3-(2-piridilditilo)-propionamida]hexanoato de
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

sulfosuccinimidilo (Pierce Chem. Co. n.º de cat. 2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., n.º de cat. 24510) conjugada con EDC.

5 Los ligadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen atributos diferentes, conduciendo así a
 10 conjugados con propiedades fisicoquímicas diferentes. Por ejemplo, ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo
 son más estables que ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los ligadores que contienen éster de NHS
 son menos solubles que ésteres de sulfo-NHS. Además, el ligador SMPT contiene un enlace disulfuro impedido
 15 estéricamente, y puede formar conjugados con estabilidad aumentada. Las uniones disulfuro son, en general, menos
 estables que otras uniones debido a que la unión disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado menos
 20 conjugado disponible. Sulfo-NHS, en particular, puede potenciar la estabilidad de acoplamientos de carbodimida.
 Los acoplamientos de carbodimida (tales como EDC) cuando se usan conjuntamente con sulfo-NHS, forman ésteres
 que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodimida sola.

15 El término “polinucleótido aislado” tal como se usa en el presente documento significará un polinucleótido de origen
 genómico, de ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el “polinucleótido
 aislado” (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el “polinucleótido aislado” se
 encuentra en la naturaleza, (2) está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza o
 (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

20 El término “proteína aislada” al que se hace referencia en el presente documento significa una proteína de origen de
 ADNc, ARN recombinante o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de
 derivación, la “proteína aislada” (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de
 otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas marinas, (3) se expresa en una célula de una
 especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza.

25 El término “polipéptido” se usa en el presente documento como término genérico para referirse a proteína nativa,
 fragmentos o análogos de una secuencia de polipéptido. Por tanto, fragmentos de proteína nativa, y análogos son
 especies del género del polipéptido. Los polipéptidos preferidos según la invención comprenden las moléculas de
 30 inmunoglobulina de cadena pesada humana representadas por las figuras 1B, 2B, 3B y 4B y las moléculas de
 inmunoglobulina de cadena ligera humana representadas por las figuras 1D, 2D, 3D y 4D, así como moléculas de
 anticuerpo formadas mediante combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena
 pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena
 ligera kappa, y vice versa, así como fragmentos y análogos de las mismas.

35 El término “que se produce de manera natural” tal como se usa en el presente documento tal como se aplica a un
 objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o una
 secuencia de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse a partir de una
 fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio o de otra
 manera se produce de manera natural.

40 El término “unido operativamente” tal como se usa en el presente documento se refiere a posiciones de
 componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Una
 secuencia de control “unida operativamente” a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión
 de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

45 El término “secuencia de control” 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 las secuencias codificantes a las
 que están unidas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped en
 50 procariontes, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una
 secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen
 promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” pretende incluir,
 como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también
 puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de
 55 parejas de fusión. El término “polinucleótido” tal como se le hace referencia en el presente documento significa un
 enlace polimérico de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, o bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos
 o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN mono y bicatenarias.

60 El término oligonucleótido al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos que se producen
 de manera natural y modificados unidos entre sí mediante uniones oligonucleotídicas que se producen de manera
 natural y que no se producen de manera natural. Oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que
 comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen de 10 a
 60 bases de longitud y lo más preferiblemente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases de longitud. Los
 oligonucleótidos habitualmente son monocatenarios, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden
 ser bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la
 65 invención son oligonucleótidos o bien sentido o bien antisentido.

El término “nucleótidos que se producen de manera natural” al que se hace referencia en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados” al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “uniones oligonucleotídicas” al que se hace referencia en el presente documento incluye uniones oligonucleotídicas tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato, fosforonmidato, y similares. Véanse por ejemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); Stec *et al.* patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para su detección, si se desea.

El término “se hibrida selectivamente” al que se hace referencia en el presente documento significa que se une de manera detectable y específica. Polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos según la invención se hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan las cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectiva tal como se conoce en la técnica y se comenta en el presente documento. Generalmente, la homología de la secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos el 80%, y más normalmente con homologías preferiblemente crecientes de al menos el 85%, el 90%, el 95%, el 99% y el 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando se alinean las dos secuencias para lograr el apareamiento máximo. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que están haciéndose coincidir) en la maximización. Se prefieren longitudes de hueco de coincidencia de 5 o menos, prefiriéndose más 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptido derivadas de las mismas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como se usa este término en el presente documento, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o más. Véase Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y el suplemento 2 de este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son idénticos en más de o igual al 50% cuando se alinean de manera óptima usando el programa ALIGN. El término “corresponde a” se usa en el presente documento queriendo decir que una secuencia de polinucleótido es homóloga (es decir, es idéntica, no relacionada de manera evolutiva estrictamente) a toda o a una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia, o que una secuencia de polipéptido es idéntica a una secuencia de polipéptido de referencia. Por el contrario, el término “complementaria a” se usa en el presente documento queriendo decir que la secuencia complementaria es homóloga a toda o a una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos “TATAC” corresponde a una secuencia “TATAC” de referencia y es complementaria a una secuencia “GTATA” de referencia.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótido o aminoácidos: “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” e “identidad sustancial”. Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como segmento de una secuencia génica o de ADNc de longitud completa facilitada en una lista de secuencias o puede comprender una secuencia génica o de ADNc completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos de longitud, y a menudo al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Puesto que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos pueden comprender cada una (1) una secuencia (es decir, una parte de la secuencia de polinucleótido o aminoácidos completa) que es similar entre las dos moléculas, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) moléculas se realizan normalmente comparando secuencias de las dos moléculas con respecto a una “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una “ventana de comparación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótido contiguos o 6 aminoácidos en los que una secuencia de polinucleótido o aminoácidos puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos y en la que la parte de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones, deleciones, sustituciones, y similares (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A). 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el software Wisconsin Genetics Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), paquetes de software Geneworks o MacVector), o mediante inspección y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da como resultado el mayor porcentaje de homología con respecto a

la ventana de comparación) generada mediante los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótido o aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido-a-nucleótido o residuo-a-residuo) con respecto a la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima con respecto a la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o residuo idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia de polinucleótido o aminoácidos, en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85 por ciento, preferiblemente una identidad de al menos el 90 al 95 por ciento, más habitualmente una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia con respecto a una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótido (6 aminoácidos), frecuentemente con respecto a una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótido (8-16 aminoácidos), en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que totalizan el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia con respecto a la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituídos, N-alkilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también puede ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección a mano izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección a mano derecha es la dirección carboxilo-terminal, según el uso y la convención habituales.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo a mano izquierda de secuencias de polinucleótido monocatenarias es el extremo 5', la dirección a mano izquierda de secuencias de polinucleótido bicatenarias se denomina la dirección de 5'. La dirección de adición 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. Regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 5'", regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 3'".

Tal como se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptido, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos el 80 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 90 por ciento, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 95 por ciento y lo más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento.

Preferiblemente, posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácido conservativas.

Sustituciones de aminoácido conservativas se refieren a la capacidad de intercambiar residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de alifáticas-de hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido glutámico-ácido aspártico y asparagina-glutamina.

Los expertos habituales en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina.

Los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal preferidos de fragmentos o análogos aparecen junto a los límites de dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales mediante comparación de los datos de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferiblemente, se usan métodos de comparación computerizados para identificar motivos de secuencia o dominios

de conformación de proteínas predichos que aparecen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteína que se pliegan para dar una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Por tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según la invención.

El término “fragmento de polipéptido” tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino terminal y/o carboxilo-terminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia que se produce de manera natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos normalmente tienen al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de longitud más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, habitualmente al menos 50 aminoácidos de longitud e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud.

El término “agente” se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “marcador” o “marcado” se refieren a la incorporación de una marca detectable, por ejemplo, mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotínulo que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o calorimétricos). En determinadas situaciones, el marcador o la marca también pueden ser terapéuticos. En la técnica se conocen y pueden usarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa del rábano, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), agentes quimioluminiscentes, grupos biotínulo, epítomos de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopo). En algunas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. El término “fármaco o agente farmacéutico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o una composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

Otros términos químicos en el presente documento se usan según el uso convencional en la técnica, tal como se muestra a modo de ejemplo en el diccionario de Términos Químicos de McGraw-Hill (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

El término “agente antineoplásico” se usa en el presente documento para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o la progresión de una neoplasia en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. Frecuentemente, la inhibición de la metástasis es una propiedad de agentes antineoplásicos.

Tal como se usa en el presente documento, “sustancialmente puro” significa que una especie objetivo es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objetivo comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, el 90%, el 95% y el 99%. Lo más preferiblemente, la especie objetivo se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

Un anticuerpo frente a huCD3 se genera, por ejemplo, inmunizando ratones xenogénicos que pueden desarrollar anticuerpos completamente humanos (véase el ejemplo 1). Un anticuerpo IgG anti-huCD3 se genera, por ejemplo, convirtiendo un anticuerpo IgM anti-CD3 producido mediante un ratón transgénico (véase el ejemplo 2). Alternativamente, un anticuerpo frente a huCD3 de este tipo se desarrolla, por ejemplo, usando métodos de presentación in fago usando anticuerpos que contiene sólo secuencias humanas. En la técnica se conocen bien tales enfoques, por ejemplo, en el documento WO92/01047 y la patente estadounidense n.º 6.521.404. En este enfoque, se examina una biblioteca combinatoria de fagos que portan pares al azar de cadenas ligeras y pesadas

usando una fuente natural o recombinante de CD3 o fragmentos de la misma.

Se dan a conocer métodos para producir un anticuerpo frente a huCD3 mediante un procedimiento en el que al menos una etapa del procedimiento incluye inmunizar un animal no humano, transgénico con proteína CD3 humana. Algunos de los loci de cadena pesada y/o cadena ligera kappa endógenos de este animal no humano xenogénico se han inhabilitado y no pueden realizar la redistribución requerida para generar genes que codifican para inmunoglobulinas en respuesta a un antígeno. Además, al menos un locus de cadena pesada humana y al menos un locus de cadena ligera humana se han transfectado de manera estable en el animal. Por tanto, en respuesta a un antígeno administrado, los loci humanos se disponen para proporcionar genes que codifican para regiones variables humanas inmunoespecíficas para el antígeno. Tras la inmunización, por tanto, el XenoMouse produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas.

En la técnica se conocen bien una variedad de técnicas para producir animales no humanos xenogénicos. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.º 6.075.181 y n.º 6.150.584. Mediante una estrategia, se introducen los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera xenogénicos (humanos) en la línea germinal del huésped (por ejemplo, esperma u ovocitos) y, en etapas separadas, los genes huésped correspondientes se vuelven no funcionales mediante inactivación usando recombinación homóloga. Se reconstruyen los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena ligera humanos en un microorganismo eucariota o procariota apropiado, y se introducen los fragmentos de ADN resultantes en el huésped apropiado, por ejemplo, los pronúcleos de ovocitos fertilizados o células madre embrionarias de ratón. La inactivación de los loci de inmunoglobulina del huésped endógenos se logra mediante alteración dirigida de los loci apropiados mediante recombinación homóloga en las células huésped, particularmente células madre embrionarias o pronúcleos de ovocitos de ratón fertilizados. La alteración dirigida puede implicar la introducción de una lesión o delección en el locus diana, o delección dentro del locus diana acompañada por inserción en el locus, por ejemplo, inserción de un marcador seleccionable. En el caso de células madre embrionarias, se generan animales quiméricos que se derivan en parte de las células madre embrionarias modificadas y pueden transmitir las modificaciones genéticas a través de la línea germinal. El apareamiento de huéspedes a los que se les ha introducido loci de inmunoglobulina humana con cepas con loci endógenos inactivados proporcionará animales cuya producción de anticuerpos es puramente xenogénica, por ejemplo, humana.

En una estrategia alternativa, se usan al menos partes de los loci de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanos para reemplazar directamente los loci de inmunoglobulina endógenos correspondientes mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias. Esto da como resultado inactivación y reemplazo simultáneos de la inmunoglobulina endógena. A esto le sigue la generación de animales quiméricos en los que las células derivadas de células madre embrionarias puede contribuir a las líneas germinales.

Por ejemplo, un clon de células B que expresa anticuerpo humano anti-CD3 se retira del animal no humano xenogénico y se immortaliza según diversos métodos conocidos dentro de la técnica. Tales células B pueden derivarse directamente de la sangre del animal o de tejidos linfoides, incluyendo pero sin restringirse a bazo, amígdalas, ganglios linfáticos y médula ósea. Las células B immortalizadas, resultantes pueden expandirse y cultivarse *in vitro* par producir grandes cantidades, aplicables clínicamente de anticuerpo frente a huCD3. Alternativamente, pueden recuperarse genes que codifican para las inmunoglobulinas con una o más regiones variables humanas y expresarse en un tipo de célula diferente, incluyendo pero sin restringirse a un sistema de cultivo de células de mamífero, con el fin de obtener los anticuerpos directamente o cadenas individuales de los mismos, compuestos por moléculas de F_v de cadena sencilla.

Además, todo el conjunto de anticuerpos anti-CD3 completamente humanos generados por el animal no humano xenogénico puede examinarse para identificar uno clon de este tipo con las características óptimas. Tales características incluyen, por ejemplo, afinidad de unión a la proteína CD3 humana, estabilidad de la interacción así como el isotipo del anticuerpo anti-CD3 completamente humano. Entonces se usan clones a partir de todo el conjunto que tienen las características deseadas como fuente de secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones variables deseadas, para una manipulación adicional para generar anticuerpos con estas características, en sistemas de células alternativos, usando técnicas recombinantes o transgénicas convencionales.

Esta estrategia general se demostró junto con la generación de la primera variedad de XenoMouse™ tal como se publicó en 1994. Véase Green *et al.* Nature Genetics 7:13-21 (1994). Este enfoque se discute y se define adicionalmente en las solicitudes de patente estadounidenses con n.º de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, presentada 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430.938, 27 de abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996 y 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las patentes estadounidenses n.ºs 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las patentes japonesas n.ºs 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y

3 068 507 B2. Véanse también Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. Exp. Med.: 188:483-495 (1998). Véanse también la patente europea n.º, EP 0 463 151 B1, concesión publicada el 12 de junio de 1996, la solicitud de patente internacional n.º WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la solicitud de patente internacional n.º WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, el documento WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998, el documento WO 00/76310, publicado el 21 de diciembre de 2000.

En un enfoque alternativo, otros han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus de Ig exógeno a través de la inclusión de trozos (genes individuales) del locus de Ig. Por tanto, uno o más genes de V_H, uno o más genes de D_H, uno o más genes de J_H, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en un constructo para su inserción en un animal. Este enfoque se describe en la patente estadounidense n.º 5.545.807 concedida a Surani *et al.* y la patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299, y 6.255.458 todas concedidas a Lonberg y Kay, las patentes estadounidenses n.ºs 5.591.669 y 6.023.010 concedidas a Krimpenfort y Berns, las patentes estadounidenses n.ºs 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 concedidas a Berns *et al.*, y la patente estadounidense n.º 5.643.763 concedida a Choi y Dunn, y las solicitudes de patente estadounidenses de GenPharm International con n.ºs de serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 081161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véanse también la patente europea n.º 0 546 073 B1, las solicitudes de patente internacionales n.ºs WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884 y la patente estadounidense n.º 5.981.175. Véanse además Tailor *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1993, Tuailon *et al.*, 1993, Choi *et al.*, 1993, Lonberg *et al.*, (1994), Tailor *et al.*, (1994), y Tuailon *et al.*, (1995), Fishwild *et al.*, (1996).

Una ventaja del enfoque de minilocus es la rapidez con la que pueden generarse constructos que incluyen partes del locus de Ig e introducirse en animales. Sin embargo, por consiguiente, una desventaja significativa del enfoque de minilocus es que, en teoría, se introduce diversidad insuficiente a través de la inclusión de números pequeños de genes de V, D y J. De hecho, los trabajos publicados parecen apoyar este problema. El desarrollo de células B y la producción de anticuerpos de animales producidas a través del uso de los minilocus parecen detenidos. Por tanto, la investigación que rodea la presente invención se ha dirigido consecuentemente hacia la introducción de partes grandes del locus de Ig con el fin de lograr mayor diversidad y en un esfuerzo por reconstituir el repertorio inmunitario de los animales.

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de fusión de microcélulas, se han introducido trozos grandes de cromosomas, o cromosomas completos. Véanse las solicitudes de patente europeas n.ºs 773 288 y 843 961.

Respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) han conducido a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de otra manera. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable inmunitaria, se espera que se observen determinadas respuestas de anticuerpos humanos anti-anticuerpo quimérico (HACA), particularmente en utilizaciones crónicas o de múltiples dosis del anticuerpo. Por tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra CD3 con el fin de menoscabar problemas y/o efectos de respuesta de HAMA o HACA.

La producción de anticuerpos con inmunogenicidad reducida también se logra por medio de técnicas de humanización y presentación usando bibliotecas apropiadas. Se apreciará que pueden humanizarse o primatizarse anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, Winter y Harris Immunol Today 14:43 46 (1993) y Wright *et al.* Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede modificarse por ingeniería genética mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3, bisagra y/o el dominio de entramado por la secuencia humana correspondiente (véanse el documento WO 92102190 y las patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). Además, se conoce en la bibliografía el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos (Liu *et al.* P.N.A.S. 84:3439 (1987) y J. Immunol. 139:3521 (1987)). Se aísla ARNm a partir de un hibridoma u otra célula que produce el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se prepara una biblioteca y se examina para aislar la secuencia de interés. Entonces se fusiona la secuencia de ADN que codifica para la región variable del anticuerpo con secuencias de regiones constantes humanas. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas pueden encontrarse en Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, publicación de N.I.H. n.º 91-3242. Genes de regiones C humanas están fácilmente disponibles de clones conocidos. La elección de isotipo estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación del complemento, o actividad en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Isotipos preferidos son IgG1, IgG3 e IgG4. Pueden usarse cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana kappa o lambda. El anticuerpo quimérico,

humanizado se expresa entonces mediante métodos convencionales.

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante escisión química o con proteasas. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica para una parte del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican para el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguidas por un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

Pueden usarse secuencias consenso de regiones J H y L para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la unión posterior de segmentos de región V a segmentos de región C humana. Puede modificarse el ADNc de la región C mediante mutagénesis dirigida al sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, episomas derivados de VEB, y similares. Un vector conveniente es uno que codifica para una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados modificados por ingeniería genética de modo que pueda insertarse y expresarse cualquier secuencia de VH o VL -31. En tales vectores, habitualmente se produce corte y empalme entre el sitio donador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que aparecen dentro de los exones de CH humanos. Se produce poliadenilación y terminación de la transcripción en sitios cromosómicos nativos en el sentido de 3' de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante puede unirse a cualquier promotor fuerte, incluyendo LTR retrovirales, por ejemplo, promotor temprano de SV-40 (Okayama *et al.* Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)), LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.* P.N.A.S. 79:6777 (1982)) y LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (Grosschedl *et al.* Cell 41:885 (1985)). Además, tal como se apreciará, pueden usarse promotores de Ig nativos y similares.

Además, pueden generarse anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies a través de tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fago, presentación retroviral, presentación ribosómica y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales técnicas se conocen bien en la técnica. Wright y Harris, citado anteriormente, Hanes y Pluchau PEAS USA 94:4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith Gene 73:305-318 (1988) (presentación en fago), Scott TIB5 17:241-245 (1992), Cwirla *et al.* PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel *et al.* Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom *et al.* Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992), y la patente estadounidense n.º 5.733.743. Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos pueden humanizarse tal como se describió anteriormente.

Usando estas técnicas, pueden generarse anticuerpos frente a células que expresan CD3, la propia CD3, formas de CD3, epítomos o péptidos de la misma, y bibliotecas de expresión para la misma (véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.703.057) que después de eso pueden examinarse tal como se describió anteriormente para las actividades descritas anteriormente.

Diseño y generación de otros productos terapéuticos

Basándose en la actividad de los anticuerpos que se producen y caracterizan en el presente documento con respecto a CD3, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de restos de anticuerpo. Tales modalidades incluyen, sin limitación, productos terapéuticos de anticuerpos avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas y productos terapéuticos radiomarcados, generación de productos terapéuticos peptídicos, terapias génicas, particularmente intracuerpos, productos terapéuticos antisentido y moléculas pequeñas.

Por ejemplo, en relación con anticuerpos biespecíficos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad frente a CD3 y otro frente a una segunda molécula que están conjugados entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica frente a CD3 y una segunda cadena específica frente a una segunda molécula o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad frente a CD3 y la otra molécula. Tales anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando técnicas que se conocen bien, por ejemplo, en relación con (i) y (ii) véase por ejemplo, Fanger *et al.* Immunol Methods 4:72-81 (1994) y Wright y Harris, citado anteriormente, y en relación con (iii) véase por ejemplo, Traunecker *et al.* Int. J. Cancer (supl.) 7:51-52 (1992). En cada caso, la segunda especificidad puede prepararse frente a los receptores de activación de la cadena pesada, incluyendo, sin limitación, CD16 o CD64 (véase por ejemplo, Deo *et al.* 18:127 (1997)) o CD89 (véase por ejemplo, Valerius *et al.* Blood 90:4485-4492 (1997)). Sería probable que los anticuerpos biespecíficos preparados según lo anterior destruyesen células que expresan CD3, y particularmente las células en las que los anticuerpos frente a CD3 de la invención son eficaces.

En relación con inmunotoxinas, pueden modificarse anticuerpos para que actúen como inmunotoxinas utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Vitetta Immunol Today 14:252 (1993). Véase también la patente estadounidense n.º 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados,

tales anticuerpos modificados también pueden prepararse fácilmente utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Junghans *et al.* en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chaker y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471 y 5.697.902. Sería probable que cada una de las inmunotoxinas y las moléculas radiomarcadas destruyese células que expresan CD3, y particularmente las células en las que los anticuerpos de la invención son eficaces.

En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de información estructural relacionada con CD3 y anticuerpos frente a la misma, tales como los anticuerpos de la invención o el examen de bibliotecas de péptidos, pueden generarse péptidos terapéuticos que se dirigen contra CD3. El diseño y el examen de productos terapéuticos peptídicos se comenta en relación con Houghten *et al.* *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla *et al.* *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake y Litz-Davis *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). También pueden prepararse inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas y, de manera similar, en relación con restos peptídicos tal como se comentó anteriormente en relación con anticuerpos. Suponiendo que la molécula de CD3 (o una forma, tal como una variante de corte y empalme o forma alternativa) es funcionalmente activa en un proceso patológico, será posible diseñar productos terapéuticos génicos y antisentido frente a la misma a través de técnicas convencionales. Tales modalidades pueden utilizarse para modular la función de CD3. En relación con lo mismo los anticuerpos de la presente invención facilitan el diseño y uso de ensayos funcionales relacionados con los mismos. Se comenta un diseño y una estrategia para productos terapéuticos antisentido en detalle en la solicitud de patente internacional n.º WO 94/29444. El diseño y las estrategias para terapia génica se conocen bien. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas terapéuticas génicas que implican intracuerpos podría demostrarse que es particularmente ventajoso. Véase por ejemplo, Chen *et al.* *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994) y Marasco *Gene Therapy* 4:11-15 (1997). También se comentan el diseño general de y consideraciones relacionadas con productos terapéuticos génicos en la solicitud de patente internacional n.º WO 97/38137.

El conocimiento extraído de la estructura de la molécula de CD3 y sus interacciones con otras moléculas según la presente invención, tales como los anticuerpos de la invención, y otros puede utilizarse para diseñar de manera racional modalidades terapéuticas. En este aspecto, pueden utilizarse técnicas de diseño racional de fármacos tales como cristalografía de rayos X, modelado molecular computerizado (o asistido) (CAMM), relaciones de estructura-actividad cuantitativas o cualitativas (QSAR) y tecnologías similares para centrarse en los esfuerzos de descubrimiento de fármacos. El diseño racional permite la predicción de las estructuras sintéticas o de proteína que pueden interactuar con la molécula o formas específicas de la misma que pueden usarse para modificar o modular la actividad de CD3. Tales estructuras pueden sintetizarse químicamente o expresarse en sistemas biológicos. Este enfoque se ha revisado en Capsey *et al.* *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). Además, pueden diseñarse y sintetizarse bibliotecas combinatorias y usarse en programas de examen, tales como esfuerzos de examen de alto rendimiento.

Administración terapéutica y formulaciones

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la invención se administrará con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar transferencia, administración, tolerancia, y similares mejoradas. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's *Pharmaceutical Sciences* (15ª ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el capítulo 87 por Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite-en-agua y agua-en-aceite, emulsiones Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente invención, siempre que el principio activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance". *Regul. Toxicol Pharmacol.* 32(2): 210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts". *J Pharm Sci.* 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311 (1998) y las menciones en los mismos para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y portadores bien conocidos por químicos farmacéuticos.

Las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo frente a huCD3 de la invención, son para su uso en el tratamiento o el alivio de un síntoma asociado con un trastorno relacionado con la inmunidad, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, que es una enfermedad viral con un componente autoinmunitario), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria,

5 enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLPA), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (PTA), enfermedad de Behcet, cardiomiopatía, esprúe celíaco-dermatitis herpetiforme; síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (SDIFC), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutininas frías, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómenos de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (ESP), también conocida como esclerosis sistémica (ES)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

10 Los trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eczema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto frente a huésped, anemias hemolíticas, osteoartritis, septicemia, accidente cerebrovascular, trasplante de tejido y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilador.

15 Opcionalmente, se administran las composición de anticuerpo frente a huCD3 de la invención conjuntamente con un segundo agente tal como, por ejemplo, GLP-1 o un compuesto que deja en reposo células beta (es decir, un compuesto que reduce o inhibe de otra forma la liberación de insulina, tal como compuestos que abren canales de potasio). Se describen ejemplos de compuestos de GLP-1 adecuados en, por ejemplo, la solicitud publicada U.S. 20040037826, y se describen compuestos adecuados que dejan en reposo células beta en la solicitud publicada U.S. 20030235583.

20 Opcionalmente, las composiciones de anticuerpo frente a huCD3 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la inmunidad se administran en combinación con cualquiera de una variedad de compuestos inmunosupresores y/o antiinflamatorios conocidos. Los compuestos conocidos adecuados incluyen, pero no se limitan a metotrexato, ciclosporina A (incluyendo, por ejemplo, microemulsión de ciclosporina), tacrolimús, corticosteroides, estatinas, interferón beta, Remicade (infliximab), Enbrel (etanercept) y Humira (adalimumab).

25 Por ejemplo, en el tratamiento de artritis reumatoide, las composiciones de anticuerpo frente a huCD3 de la invención pueden coadministrarse con corticosteroides, metotrexato, ciclosporina A, estatinas, Remicade (infliximab), Enbrel (etanercept) y/o Humira (adalimumab).

30 En el tratamiento de uveítis, las composiciones de anticuerpo frente a huCD3 pueden administrarse conjuntamente con, por ejemplo, corticosteroides, metotrexato, ciclosporina A, ciclofosfamida y/o estatinas. Asimismo, pueden tratarse pacientes aquejados de una enfermedad tal como enfermedad de Crohn o psoriasis con una combinación de una composición de anticuerpo frente a huCD3 de la invención y Remicade (infliximab) y/o Humira (adalimumab).

35 Pacientes con esclerosis múltiple pueden recibir una combinación de una composición de anticuerpo frente a huCD3 de la invención en combinación con, por ejemplo, acetato de glatirámico (Copaxone), interferón beta-1 a (Avonex), interferón beta-1a (Rebif), interferón beta-1b (Betaseron o Betaferon), mitoxantrona (Novantrone), dexametasona (Decadron), metilprednisolona (Depo-Medrol) y/o prednisona (Deltasone) y/o estatinas.

40 La presente invención también proporciona anticuerpos para su uso en el tratamiento o el alivio de un síntoma asociado con un trastorno relacionado con la inmunidad o un síntoma asociado con rechazo tras trasplante de órgano. Por ejemplo, las composiciones de la invención para su uso en el tratamiento o alivio de un síntoma de cualquiera de las enfermedades autoinmunitarias y trastornos inflamatorios descritos en el presente documento.

45 Las composiciones terapéuticas de la invención también son adecuadas para su uso como agentes de inmunosupresión en trasplante de órgano o tejido. Tal como se usa en el presente documento, "agente de inmunosupresión" se refiere a un agente cuya acción sobre el sistema inmunitario conduce a la reducción inmediata o retrasada de la actividad de al menos una ruta implicada en una respuesta inmunitaria, ya se produzca esta respuesta de manera natural o se desencadene artificialmente, ya tenga lugar esta respuesta como parte del sistema inmunitario innato, el sistema inmunitario adaptativo o ambos. Estas composiciones de anticuerpo frente a huCD3 inmunosupresoras se administran a un sujeto antes de, durante y/o después del trasplante de órgano o tejido. Por ejemplo, se usa un anticuerpo frente a huCD3 de la invención para tratar o prevenir el rechazo tras trasplante de órgano o tejido.

50 Opcionalmente, las composiciones de anticuerpo frente a huCD3 inmunosupresoras de la invención se administran conjuntamente con un segundo agente tal como, por ejemplo, GLP-1 o un compuesto que deja en reposo células

beta, tal como se describió anteriormente.

5 Alternativamente, estas composiciones de anticuerpo frente a huCD3 inmunosupresoras se administran en combinación con cualquiera de una variedad de compuestos antiinflamatorios y/o inmunosupresores conocidos. Los compuestos antiinflamatorios y/o inmunosupresores adecuados para su uso con los anticuerpos frente a huCD3 de la invención incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclosporina A (incluyendo, por ejemplo, microemulsión de ciclosporina), tacrolímús, corticosteroides y estatinas.

10 En otra alternativa, se administra un anticuerpo frente a huCD3 a un individuo humano tras la detección de la presencia de anticuerpos autorreactivos dentro del individuo humano. Tales anticuerpos autorreactivos se conocen dentro de la técnica como anticuerpos con afinidad de unión por una o más proteínas expresadas de manera endógena dentro del individuo humano. Opcionalmente, se somete a prueba al individuo humano para detectar la presencia de anticuerpos autorreactivos implicados específicamente en una o más enfermedades autoinmunitarias que se conocen bien dentro de la técnica. Específicamente, se somete a prueba a un paciente humano para detectar 15 la presencia de anticuerpos contra insulina, ácido glutámico descarboxilasa y/o la proteína IA-2, y posteriormente se le administra un anticuerpo frente a huCD3 tras la detección positiva de uno o más de tales anticuerpos autorreactivos.

20 También se da a conocer la administración de un anticuerpo frente a huCD3 a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir el reclutamiento de células inmunitarias en tejidos humanos. Se administra un anticuerpo frente a huCD3 de la invención a un sujeto que lo necesita para prevenir y tratar estados asociados con reclutamiento de células inmunitarias anómalo o desregulado en sitios tisulares de enfermedad humana.

25 También se da a conocer la administración de un anticuerpo frente a huCD3 a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir la extravasación y diapédesis de células inmunitarias a tejidos humanos. Por tanto, los anticuerpos frente a huCD3 de la invención se administran para prevenir y/o tratar estados asociados con infiltración de células inmunitarias anómala o desregulada en sitios tisulares de enfermedad humana.

30 También se da a conocer la administración de un anticuerpo frente a huCD3 a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir los efectos mediados por la liberación de citocinas dentro del cuerpo humano. El término "citocina" se refiere a todas las citocinas humanas conocidas dentro de la técnica que se unen a receptores extracelulares en la superficie celular y de ese modo modulan la función celular, incluyendo pero sin limitarse a IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

35 La liberación de citocinas puede conducir a un estado tóxico conocido como síndrome de liberación de citocinas (SLC), una complicación clínica común que se produce, por ejemplo, con el uso de un anticuerpo anti-células T tal como ATG (anti-globulina de timocitos) y OKT3 (un anticuerpo murino anti-CD3 humano). Este síndrome se caracteriza por la liberación excesiva de citocinas tales como TNF, IFN-gamma e IL-2 a la circulación. El SLC se produce como resultado de la unión simultánea de los anticuerpos a CD3 (por medio de la región variable del anticuerpo) y los receptores de Fc y/o receptores del complemento (por medio de la región constante del anticuerpo) sobre otras células, activando de ese modo las células T para que liberen citocinas que producen una respuesta inflamatoria sistémica caracterizada por hipotensión, pirexia y escalofríos intensos. Los síntomas del SLC incluyen fiebre, escalofríos moderados, náuseas, vómitos, hipotensión y disnea. Por tanto, el anticuerpo frente a huCD3 de la invención contiene una o más mutaciones diseñadas para impedir la liberación y producción anómalas de una o más 45 citocinas *in vivo*.

50 También se da a conocer la administración de un anticuerpo frente a huCD3 a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir los efectos mediados por la liberación de receptores de citocinas dentro del cuerpo humano. El término "receptor de citocinas" se refiere a todos los receptores de citocinas humanas dentro de la técnica que se unen a una o más citocinas, tal como se definen en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse a receptores de las citocinas mencionadas anteriormente. Por tanto, se administra un anticuerpo frente a huCD3 de la invención para tratar y/o prevenir estados mediados a través de la activación, unión o ligamiento anómalos de uno o más receptores de citocinas dentro del cuerpo humano. Se prevé además que la administración del anticuerpo frente a huCD3 *in vivo* agote la señalización intracelular mediada por receptor(es) de citocinas dentro de tal sujeto humano.

55 Finalmente, se da a conocer la administración de un anticuerpo frente a huCD3 a un individuo humano tras la disminución de la función de células beta pancreáticas en el mismo. Opcionalmente, se somete a prueba al individuo para determinar la función de células beta, la secreción de insulina o los niveles de péptido c tal como se conoce dentro de la técnica. Posteriormente, tras notar una disminución suficiente de cualquier indicador, se le administra al individuo humano un régimen de dosificación suficiente de un anticuerpo frente a huCD3 para prevenir la progresión 60 adicional de la destrucción autoinmunitaria de la función de células beta en el mismo.

Formulaciones de diagnóstico y profilácticas

65 Se dan a conocer los AcM anti-CD3 completamente humanos de la invención para su uso en formulaciones de diagnóstico y profilácticas. Por ejemplo, puede administrarse un ACM frente a huCD3 de la invención a pacientes

que corren el riesgo de desarrollar una de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente. La predisposición de un paciente a una o más de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente puede determinarse usando marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos. Por ejemplo, la presencia de subtipos de HLA particulares y autoanticuerpos serológicos (contra insulina, GAD65 y IA-2) es indicativa de diabetes tipo I.

Alternativamente, se administra un anticuerpo frente a huCD3 a individuos humanos a los que se les diagnostica una o más de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente. Tras el diagnóstico, se administra un anticuerpo frente a huCD3 para mitigar o revertir los efectos de la autoinmunidad. En un ejemplo de este tipo, se le administra a un individuo humano al que se le diagnostica diabetes tipo I una dosis suficiente de un anticuerpo frente a huCD3 para restaurar la función pancreática y minimizar el daño de la infiltración autoinmunitaria en el páncreas. Alternativamente, se le administra a un individuo humano al que se le diagnostica artritis reumatoide un anticuerpo frente a huCD3 para reducir la infiltración de células inmunitarias en y la destrucción de articulaciones de extremidades.

Los anticuerpos de la invención también son útiles en la detección de CD3 en muestras de pacientes y por consiguiente son útiles como agentes de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos frente a huCD3 de la invención se usan en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA, para detectar los niveles de CD3 en una muestra de paciente.

Puede inmovilizarse un anticuerpo frente a huCD3 de la invención sobre un soporte sólido (por ejemplo, el/los pocillo(s) de una placa de microtitulación). El anticuerpo inmovilizado sirve como anticuerpo de captura para cualquier CD3 que pueda estar presente en una muestra de prueba. Antes de poner en contacto el anticuerpo inmovilizado con una muestra de paciente, se enjuaga el soporte sólido y se trata con un agente de bloqueo tal como albúmina o proteína de visón para impedir la adsorción no específica del analito.

Posteriormente, se tratan los pocillos con una muestra de prueba que se sospecha que contiene el antígeno, o con una disolución que contiene una cantidad convencional del antígeno. Una muestra de este tipo puede ser, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto que se sospecha que tiene niveles de antígeno circulante que se considera que son diagnóstico de una patología. Tras eliminar por enjuagado la muestra de prueba o patrón, se trata el soporte sólido con un segundo anticuerpo que está marcado de manera detectable. El segundo anticuerpo marcado sirve como anticuerpo de detección. El nivel de marcador detectable se mide, y la concentración de antígeno CD3 en la muestra de prueba se determina mediante comparación con una curva patrón desarrollada a partir de las muestras patrón.

Se apreciará que basándose en los resultados obtenidos usando los anticuerpos frente a huCD3 de la invención en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible determinar el estadio de una enfermedad (por ejemplo, un trastorno autoinmunitario o inflamatorio) en un sujeto basándose en los niveles de expresión del antígeno CD3. Para una enfermedad dada, se toman muestras de sangre de los sujetos a los que se les diagnostica que están en diversos estadios en la progresión de la enfermedad, y/o en diversos puntos en el tratamiento terapéutico de la enfermedad. Usando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada estadio de la progresión o terapia, se designa un intervalo de concentraciones del antígeno que pueden considerarse características de cada estadio.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados logrados se proporcionan para fines ilustrativos sólo y no debe interpretarse que limitan la presente invención.

EJEMPLO 1: Generación de anticuerpos frente a huCD3

Estrategias de inmunización: Para generar un anticuerpo frente a huCD3 completamente humano, se utilizaron dos líneas de ratones transgénicos, los ratones HuMab® y los ratones KM™ (Medarex, Princeton NJ). Las estrategias de inmunización iniciales siguieron protocolos bien documentados a partir de la bibliografía para generar anticuerpos de ratón. (Véanse por ejemplo, Kung P, *et al.*, Science; 206(4416): 347-9 (1979); Kung PC, *et al.*, Transplant Proc. (3 supl. 1):141-6 (1980); Kung PC, *et al.*, Int J Immunopharmacol. 3 (3):175-81 (1981)). Los protocolos convencionales conocidos en la técnica no pudieron producir anticuerpos anti-CD3 completamente humanos en el ratón HuMab® o el ratón KM™. Por ejemplo, las siguientes estrategias de inmunización no fueron satisfactorias y no produjeron anticuerpos funcionales en los ratones o bien HuMab® o bien KM™:

- inmunización con timocitos sólo o células T sólo
- inmunización con material de CD3 humano recombinante sólo
- inmunización con material de CD3 recombinante en adyuvante de Freund
- inmunización con célula en adyuvante de Freund

- inmunización con timocitos o células T coadministrado con CD3 soluble

- inmunización con timocitos o células T coadministrado con células que expresan CD3 recombinante

5 Cuando se usan estas estrategias de inmunización de la técnica anterior en un ratón BALB/c en lugar de un ratón HuMAb® o KM™, estas estrategias producen un anticuerpo anti-CD3 murino en vez de un anticuerpo anti-CD3 humano.

10 Por consiguiente, se desarrollaron estrategias de inmunización novedosas variando los siguientes parámetros:

- tipos de inmunógenos empleados

- frecuencia de inyección

15 - tipos de adyuvantes empleados

- tipos de técnicas de coestimulación empleadas

20 - vías de inmunización empleadas

- tipos de tejido linfoide secundario usado para la fusión

25 Se desarrollaron una serie de estrategias de inmunización novedosas, incluyendo por ejemplo, (i) inmunización con una partícula viral que expresa CD3 sólo y (ii) inmunización con señales coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD27 o combinaciones de los mismos) coadministradas con células T, timocitos o con células que se han transfectado para expresar CD3 recombinante.

30 En una primera estrategia de inmunización novedosa, denominada en el presente documento "protocolo de hiperrefuerzo", se inmunizó un ratón HuMAb® (Medarex, Inc., Princeton, NJ) o un ratón KM™ (Medarex, Inc., Kirin) inyectando en primer lugar células humanas, por ejemplo, timocitos o células T. En puntos de tiempo que oscilaban entre 1 y 8 semanas tras la inyección de los timocitos y/o células T, los ratones recibieron una o más inyecciones de "hiperrefuerzo" posteriores. La inyección de hiperrefuerzo incluía, por ejemplo, proteína soluble CD3 (por ejemplo, proteína soluble CD3 recombinante), inyecciones adicionales de timocitos o células T, células transfectadas con CD3, particular virales que expresan altos niveles de CD3, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la inyección de hiperrefuerzo contenía una combinación de proteína soluble CD3 y células transfectadas con CD3.

35 Preferiblemente, en los protocolos de inmunización de hiperrefuerzo, los ratones inmunizados recibieron dos inyecciones de hiperrefuerzo finales en los días -6 y -3 antes de la fusión de los ganglios linfáticos y/o bazo. Por ejemplo, en el ratón KM™, el tejido fusionado se deriva del bazo, y en el ratón HuMAb®, el tejido fusionado se deriva de ganglios linfáticos y/o tejido esplénico.

40 En un ejemplo del protocolo de inmunización de hiperrefuerzo, se inmunizó un ratón HuMAb™ tres veces con timocitos humanos (~10⁶ células) en los días 0, 7 y 28. Se inyectó entonces la línea de células de ovario chino (CHO) transfectada con el ADNc que codifica para las cadenas δ y ϵ de CD3 humano (CHO/CD3, ~10⁶ células) en los días 47 y 65. Se administró en el día 79 otro refuerzo con una partícula viral que expresa altos niveles de CD3 $\delta\epsilon$ en su superficie. Finalmente, se le inyectó al ratón CD3 $\delta\epsilon$ humano recombinante soluble en el día 121 y 124 antes de la fusión de los ganglios linfáticos en el día 127.

45 Se administraron todas las inmunizaciones por vía subcutánea con Ribi (Corixa Corp., Seattle WA) como adyuvante. Se fusionaron un total de 8,5x10⁶ células. Sólo siete de 470 hibridomas examinados producían un anticuerpo anti-CD3 completamente humano, y todos los anticuerpos anti-CD3 completamente humanos eran moléculas de IgM. Se seleccionaron dos de estos anticuerpos anti-CD3 como candidatos clínicos terapéuticos (figuras 1-3).

50 En un segundo ejemplo del protocolo de inmunización de hiperrefuerzo, se inmunizó un ratón KM™ dos veces con CD3 $\delta\epsilon$ humano recombinante soluble en los días 0 y 25. Entonces se usaron timocitos humanos (~10⁶ células) para el refuerzo en los días 40, 49 y 56. Se inyectó dos veces el CD3 $\delta\epsilon$ recombinante soluble en los días 70, 77, 84 y 91. Entonces se inyectó la línea de células T de ratón transfectada con el ADNc que codifica para las cadenas δ y ϵ de CD3 humano (EL4/CD3, ~10⁶ células) en el día 98. Finalmente, se le inyectó al ratón CD3 $\delta\epsilon$ humano recombinante soluble en el día 101 antes de la fusión del bazo en el día 104. Se administraron las inmunizaciones por vía intraperitoneal con alumbre como adyuvante, excepto en el día 70 en el que se usó el adyuvante Ribi. Se usó CpG como agente coestimulador en el día 0, 25, 84 y 91. Se fusionaron un total de 1,27x10⁸ células. Sólo cinco de 743 hibridomas examinados producían un anticuerpo anti-CD3 completamente humano, y todos los anticuerpos producidos eran moléculas de IgG. Se seleccionó uno de los anticuerpos anti-CD3 completamente humanos como candidato clínico terapéutico (figura 4).

Criterios de selección: Se seleccionaron los candidatos clínicos terapéuticos usando los siguientes criterios. En primer lugar, se analizó anticuerpo que se une a células positivas para CD3 frente a células negativas para CD3. Para esto, se incubaron células Jurkat positivas (J+) y células Jurkat negativas (J-) para CD3 con los diferentes anticuerpos y se evaluó la unión mediante citometría de flujo (figura 9A). En segundo lugar, un ensayo de competición en el que se evaluó la capacidad del anticuerpo candidato para inhibir la unión del anticuerpo monoclonal murino anti-OKT3 humano a células positivas para CD3 usando células J+ y se evaluó la competición mediante citometría de flujo (figura 9B). A continuación, se evaluó la modulación antigénica de CD3 y el TCR a partir de la superficie de células T de sangre periférica humana mediante citometría de flujo (figura 9C). Finalmente, se realizó un ensayo de proliferación de células T usando células T de sangre periférica humana teñidas con CFSE y se evaluó la división celular mediante citometría de flujo (figura 9D).

EJEMPLO 2: Cambio de isotipo de anticuerpos anti-CD3 humanos

Algunos anticuerpos frente a huCD3 producidos usando los protocolos novedosos descritos en el ejemplo 1 eran anticuerpos IgM. Estos anticuerpos IgM se “convirtieron” en un anticuerpo IgG, preferiblemente en un anticuerpo IgG1. Por ejemplo, los anticuerpos IgM se convirtieron mediante un procedimiento de clonación en el que se clonó la región VDJ del gen que codifica para el anticuerpo IgM en un gen de cadena pesada de IgG1 obtenido de un vector que contiene un gen que codifica para el alotipo F gamma1. Para la conversión de la cadena ligera, se clonó la secuencia de IgM en un vector que contenía la región kappa. En ratones Medarex, por ejemplo, el ratón HuMAb®, se producen múltiples cadenas ligeras, debido a la falta de exclusión alélica.

Se transfectó cada combinación de cadenas pesadas y ligeras en células 293T usando el agente de transfección FuGENE 6 (Roche Diagnostics) según las directrices del fabricante. Se sometieron a prueba los anticuerpos secretados para detectar una funcionalidad optimizada, por ejemplo, unión a antígeno diana, usando los criterios de selección descritos en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3: Modulación antigénica usando los anticuerpos frente a huCD3

Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención pueden producir modulación antigénica, que se define como la redistribución y eliminación del complejo CD3-TCR inducido por la unión al anticuerpo. La expresión en la superficie celular de otras moléculas en células T, incluyendo, por ejemplo, CD4 no se ve alterada por la exposición a un anticuerpo anti-CD3 de la invención (figura 9C).

EJEMPLO 4: Reducción del síndrome de liberación de citocinas tóxicas generado por anticuerpos frente a huCD3

Preferiblemente, los anticuerpos frente a huCD3 de la invención incluyen una mutación en la región Fc, de manera que la mutación altera el síndrome de liberación de citocinas. Tal como se describió anteriormente, el síndrome de liberación de citocinas (SLC) es una complicación inmediata común que se produce con el uso de un anticuerpo anti-células T tal como ATG (anti-globulina de timocitos) y OKT3 (un anticuerpo anti-CD3 murino). Este síndrome se caracteriza por la liberación excesiva de citocinas tales como TNF, IFN-gamma e IL-2 a la circulación. Las citocinas liberadas por las células T activadas producen un tipo de respuesta inflamatoria sistémica similar a la encontrada en infección grave caracterizada por hipotensión, pirexia y escalofríos intensos. Los síntomas de SLC incluyen, por ejemplo, fiebre, escalofríos moderados, náuseas, vómitos, hipotensión y disnea.

Los anticuerpos frente a huCD3 de la invención contienen una o más mutaciones que impiden la liberación mediada por la región constante de cadena pesada de una o más citocinas *in vivo*. En una realización, los anticuerpos frente a huCD3 de la invención son moléculas de IgG que tienen una o más de las siguientes mutaciones en una estructura principal de IgG $\gamma 1$ modificada: “ $\gamma 1$ N297A”, en la que el residuo de asparagina en la posición 297 se reemplaza por un residuo de alanina; “ $\gamma 1$ L234/A, L235/A”, en la que los residuos de leucina en las posiciones 234 y 235 se reemplazan por residuos de alanina; “ $\gamma 1$ L234/A; L235/E”, en la que el residuo de leucina en la posición 234 se reemplaza por un residuo de alanina, mientras que el residuo de leucina en la posición 235 se reemplaza por un residuo de ácido glutámico; “ $\gamma 1$ L235/E” en la que el residuo de leucina en la posición 235 se reemplaza por un residuo de ácido glutámico; y “ $\gamma 1$ D265/A” en la que el residuo de ácido aspártico en la posición 265 se reemplaza por un residuo de alanina. La numeración de los residuos de la cadena pesada descritos en el presente documento es la del índice EU (véase Kabat *et al.*, “Proteins of Immunological Interest”, US Dept. of Health & Human Services (1983)), tal como se muestra, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.624.821 y 5.648.260.

Otras modificaciones en la estructura principal de IgG $\gamma 1$ que pueden usarse en los anticuerpos frente a huCD3 de la invención incluyen, por ejemplo, “A330/S” en la que el residuo de alanina en la posición 330 se reemplaza por un residuo de serina, y/o “P331/S” en la que el residuo de prolina en la posición 331 se reemplaza por un residuo de serina.

Los anticuerpos frente a CD3 completamente humanos de la invención que tienen una mutación L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴

5 E²³⁵ en la región Fc tienen una función única, eliminación de la liberación de citocinas en presencia del anticuerpo frente a huCD3. Estudios previos están realmente en contra del uso de una mutación L → E (véase por ejemplo, Xu *et al.*, Cellular Immunology, 200, págs. 16-26 (2000), en la pág. 23). Sin embargo, estas dos mutaciones particulares en las posiciones 234 y 235 (es decir, L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴ E²³⁵) eliminaron el síndrome de liberación de citocinas, tal como se evalúa mediante un sistema de ensayo *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica humana (figuras 11A, 11B). En este ensayo, se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana usando un gradiente de Ficoll, se marcaron con CFSE y entonces se sembraron en placa las células marcadas con CFSE en placas de 96 pocillos. Se añadieron los diversos anticuerpos monoclonales a diversas diluciones y se incubaron durante 72 horas a 37°C. Tras 6 horas, se retiraron 50 µl de sobrenadante para evaluar la liberación de TNF mediante ELISA. Tras 48 horas, se retiraron 50 µl de sobrenadante para evaluar la liberación de IFN-γ mediante ELISA. Tras 72 horas, se recogieron las células y se evaluó la proliferación mediante FACS usando la intensidad de marcaje con CFSE.

15 Por tanto, al contrario que las cadenas pesadas de tipo natural, y al contrario que una serie de otras mutaciones que habían descrito otros (por ejemplo, TolerX (mutación de aglicosilación), Bluestone (mutación L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴ A²³⁵) (véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.885.573)), que conservan todas un nivel significativo de efecto de liberación de citocinas, las mutaciones L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴ E²³⁵ de los anticuerpos frente a huCD3 de la invención no presentan fenómeno de liberación de citocinas. El nivel de efecto de liberación de citocinas restante era del 100% para la Fc de tipo natural, de aproximadamente el 50 al 60% para la mutación Bluestone (L²³⁴ L²³⁵ → A²³⁴ A²³⁵) e indetectable para las mutaciones de Fc Ala/Glu descritas en el presente documento (figura 11A, 11B).

EJEMPLO 5: Identificación mediante matriz peptídica del epítipo de unión a anticuerpo frente a huCD3

25 Se han usado la síntesis y el examen mediante ELISA de grandes números de péptidos para determinar los residuos de aminoácido implicados en el epítipo para diversos anticuerpos monoclonales. (Véase por ejemplo, Geysen *et al.*, J Immunol Methods, vol. 102(2):259-74 (1987)). En los experimentos descritos en el presente documento, se adquirieron matrices de péptidos solapantes derivados de la secuencia de aminoácidos de la cadena épsilon de CD3 de Jerini (Berlín, Alemania) y posteriormente se sometieron a prueba para determinar un patrón de unión por los AcM anti-CD3 completamente humanos de la invención.

30 Se produjeron los péptidos en las matrices usando la técnica de "síntesis SPOT" para la síntesis química directa sobre soportes de membrana (véanse Frank y Overwin, Met Mol Biol, vol. 66:149-169 (1996); Kramer y Schneider-Mergener, Met Mol Biol, vol. 87:25-39 (1998)). Se unieron covalentemente los péptidos de 14 meros lineales a un soporte de celulosa Whatman 50 por el extremo C-terminal, dejando el extremo N-terminal libre (es decir, no unido). Usando técnicas de inmunotransferencia de tipo Western convencionales, estos péptidos unidos a una fase sólida revelaron que el anticuerpo monoclonal 28F11 reconocía un conjunto solapante de aminoácidos en las proximidades del extremo N-terminal (figura 10).

OTRAS REALIZACIONES

40 Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal frente a CD3 completamente humano aislado o fragmento del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende tres CDR, en el que las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera se seleccionan de:
- 5
- a. una CDR1 de cadena pesada variable (CDR1 de VH) que comprende la secuencia de aminoácidos GYGMH (SEQ ID NO: 27), una CDR2 de cadena pesada variable (CDR2 de VH) que comprende la secuencia de aminoácidos VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 28), una CDR3 de cadena pesada variable (CDR3 de VH) que comprende la secuencia de aminoácidos QMGYWTFDL (SEQ ID NO: 29), una CDR1 de cadena ligera variable (CDR1 de VL) que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30), una CDR2 de cadena ligera variable (CDR2 de VL) que comprende la secuencia de aminoácidos DASNRAT (SEQ ID NO: 31) y una CDR3 de cadena ligera variable (CDR3 de VL) que comprende la secuencia de aminoácidos QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32);
- 10
- b. una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH (SEQ ID NO: 33), una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO: 34), una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35), una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 36), RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39) o WASQGISSYLA (SEQ ID NO: 43), una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos GASSRAT (SEQ ID NO: 37), YASSLQS (SEQ ID NO: 40) o DASSLGS (SEQ ID NO: 42) y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 38) o QQYYSTLT (SEQ ID NO: 41); y
- 20
- c. una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH (SEQ ID NO: 33); una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos AIWYNGRQDYADSVKG (SEQ ID NO: 44); y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35); una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30) o RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos DASNRAT (SEQ ID NO: 31) o DASSLES (SEQ ID NO: 46); y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos QQRSNWPWT (SEQ ID NO: 45) o QQFNSTPIT (SEQ ID NO: 47)
- 25
- en el que dicho anticuerpo contiene al menos una primera mutación en la cadena pesada en la posición 234 y una segunda mutación en la posición 235, y en el que dicha primera mutación da como resultado un residuo de alanina en la posición 234 y dicha segunda mutación da como resultado un residuo de ácido glutámico en la posición 235.
- 30
- 35
2. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que inhibe la unión del anticuerpo monoclonal murino anti-OKT3 humano a un linfocito T.
- 40
3. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que se une a un epítipo que incluye total o parcialmente la secuencia de aminoácidos EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 67).
- 45
4. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de GYGMH (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 28); una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de QMGYWTFDL (SEQ ID NO: 29); una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de DASNRAT (SEQ ID NO: 31); y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32), y en el que el anticuerpo comprende además una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 50
- 55
5. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que comprende una cadena pesada con tres CDR, que comprenden una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de GYGMH (SEQ ID NO: 27); una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 28); una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de QMGYWTFDL (SEQ ID NO: 29) y una cadena ligera con tres CDR, que comprenden una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30); una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de DASNRAT (SEQ ID NO: 31); y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32), y en el que el anticuerpo comprende además una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 60
- 65
6. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que tiene una cadena pesada con tres CDR,

- 5 que comprenden una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH (SEQ ID NO: 33); una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO: 34); una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35); y una cadena ligera con tres CDR que comprenden una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 36); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); o WASQGISSYLA (SEQ ID NO: 43); una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de GASSRAT (SEQ ID NO: 37), YASSLQS (SEQ ID NO: 40) o DASSLGS (SEQ ID NO: 42); y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 38) o QQYYSTLT (SEQ ID NO: 41), y en el que el anticuerpo comprende además una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19 ó 20.
- 15 7. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que tiene una cadena pesada con tres CDR, que comprenden una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH (SEQ ID NO: 33); una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de AIWYNGRQDYADSVKG (SEQ ID NO: 44); una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35); y una cadena ligera con tres CDR, que comprenden una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 30) o RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de DASNRAT (SEQ ID NO: 31) o DASSLES (SEQ ID NO: 46); y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de QQRSNWPWT (SEQ ID NO: 45) o QQFNSYPIT (SEQ ID NO: 47), y en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 ó 26.
- 25 8. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que comprende una región de entramado 2 (FWR2) que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 73).
- 30 9. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que comprende una región de entramado 3 (FRW3) que comprende la secuencia de aminoácidos RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 74).
- 35 10. Anticuerpo según la reivindicación 1 o fragmento del mismo, que comprende una región variable ubicada C-terminal con respecto a la región CDR3, en el que dicha región variable comprende la secuencia de aminoácidos VTVSS (SEQ ID NO: 64) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3.
- 40 11. Anticuerpo según la reivindicación 10 o fragmento del mismo, que comprende una región variable ubicada C-terminal con respecto a la región CDR3, en el que dicha región variable comprende la secuencia de aminoácidos GTLVTVSS (SEQ ID NO: 65) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3.
- 45 12. Anticuerpo según la reivindicación 10 o fragmento del mismo, que comprende una región variable ubicada C-terminal con respecto a la región CDR3, en el que dicha región variable comprende la secuencia de aminoácidos WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) en una posición que es C-terminal con respecto a la región CDR3.
- 50 13. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 55 14. Anticuerpo o fragmento del mismo según cualquier reivindicación anterior para su uso como medicamento.
- 60 15. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un síntoma asociado con un trastorno relacionado con la inmunidad, o un síntoma relacionado con rechazo asociado con trasplante de órgano.
- 65 16. Uso según la reivindicación 15, en el que al sujeto se le administra además un segundo agente.
17. Uso según la reivindicación 15, en el que el trastorno relacionado con la inmunidad se selecciona de una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno inflamatorio.
18. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
19. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 18.
20. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 19.

21. Método de producción del anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas de cultivar la célula huésped según la reivindicación 20 en condiciones adecuadas para la producción del anticuerpo.

Figura 1A

>Secuencia de nucleótidos de VH de 28F11: (SEQ ID NO: 1)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATACTATGTAGAC
TCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAATGGGCTACTGGC
ACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

Figura 1B

>Secuencia de aminoácidos de VH de 28F11: (SEQ ID NO: 2)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKKYYVD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR QMGYWHFDLWGRGTLTVSS

Figura 1C

>Secuencia de nucleótidos de VL de 28F11: (SEQ ID NO: 3)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCC
AGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCC
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTT
TGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA
AGGTGGAGATCAAA

Figura 1D

>Secuencia de aminoácidos de VL de 28F11: (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIY DASNRATGI PARF
SGSGSGTDFLTLSISLEPEDFAVYYC QQRSNWPPLTFGGGTKVEIK

Figura 2A

>Secuencia de nucleótidos de VH de 23F10: (SEQ ID NO: 5)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATACTATGTAGAC
TCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAATGGGCTACTGGC
ACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

Figura 2B

>Secuencia de aminoácidos de VH de 23F10: (SEQ ID NO: 6)

QVQLVQSGGGVVSQGRSLRLSCAASGFKFS[GYGMH]WVRQAPGKGLEWVAV[IWYDGSKKYYVD]
[SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRGEDTAVYYCAR][QMGYWHFDL]WGRGTLTVSS

Figura 2C

>Secuencia de nucleótidos de VL de 23F10: (SEQ ID NO: 7)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCT
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCC
AGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTT
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTT
TGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA
AGGTGGAGATCAAA

Figura 2D

>Secuencia de aminoácidos de VL de 23F10: (SEQ ID NO: 8)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC[ASQSVSSYLA]WYQQKPGQAPRLLIY[DASNRA]TGI PARF
SGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYC[QQRSNWPPLT]FGGGTKVEIK

Figura 3A

>Secuencia de nucleótidos de VH de 27H5: (SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGAAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTATGATGGAAGTAAAAAACTATGCAGAC
TCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAAT
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAACTGGGTACAAC
GGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Figura 3B

>Secuencia de aminoácidos de VH de 27H5: (SEQ ID NO: 10)

QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFR[SYGMH]WVRQAPGKLEWVA[IWYDGSKKNYAD]
[SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR][GTGYNWFDE]WGQGLTVTVSS

Figura 3C

>Secuencia de nucleótidos de VL1 de 27H5: (SEQ ID NO: 11)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCACGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG
GCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGG
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGACCCTGAAGA
TTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACAC
GACTGGAGATTAAA

>Secuencia de nucleótidos de VL2 de 27H5: (SEQ ID NO: 12)

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
AGATCAAA

>Secuencia de nucleótidos de VL3 de 27H5: (SEQ ID NO: 13)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGCGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
AGATCAAA

>Secuencia de nucleótidos de VL4 de 27H5: (SEQ ID NO: 14)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGCAA
AAGCCCCTAAGCTCTTCATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
AGATCAAA

>Secuencia de nucleótidos de VL5 de 27H5: (SEQ ID NO: 15)

GACATCGAGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGCAA
AAGCCCCTAAGCTCTTCATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
AGATCAAA

Figura 3D

>Secuencia de aminoácidos de VL1 de 27H5: (SEQ ID NO: 16)
 EIVLTQSPRTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDR
 FSGSGSGTDFTLTISRDPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIK

>Secuencia de aminoácidos de VL2 de 27H5: (SEQ ID NO: 17)
 DILMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRF
 SSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGTKVEIK

>Secuencia de aminoácidos de VL3 de 27H5: (SEQ ID NO: 18)
 DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRF
 SSGSGSGTDFTLTISRDPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGTKVEIK

>Secuencia de aminoácidos de VL4 de 27H5: (SEQ ID NO: 19)
 DIQMTQSPFSLASVGDRVITICWASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLFIIYASSLQSGVPSRF
 SSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGTKVEIK

>Secuencia de aminoácidos de VL5 de 27H5: (SEQ ID NO: 20)
 DIEMTQSPFSLASVGDRVITICWASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLFIIYASSLQSGVPSRF
 SSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGTKVEIK

Figura 3E

VL4 de 27H5	DIQMTQSPFSLASVGDRVITICWASQGISS-YLAWYQQKPAKAPKLFIIYASSLQSGVP	59
VL5 de 27H5	DIEMTQSPFSLASVGDRVITICWASQGISS-YLAWYQQKPAKAPKLFIIYASSLQSGVP	59
VL2 de 27H5	DILMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISS-ALAWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVP	59
VL3 de 27H5	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISS-ALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVP	59
VL1 de 27H5	EIVLTQSPRTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP	60
CLAVE	:* :**** :* * * :*.::* ****.:** *****.:**:* ** ** * :**	
VL4 de 27H5	SRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGTKVEIK	106 (SEQ ID NO: 19)
VL5 de 27H5	SRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGTKVEIK	106 (SEQ ID NO: 20)
VL2 de 27H5	SRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGTKVEIK	106 (SEQ ID NO: 17)
VL3 de 27H5	SRFSGSGSGTDFTLTISRDPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGTKVEIK	106 (SEQ ID NO: 18)
VL1 de 27H5	DRFSGSGSGTDFTLTISRDPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIK	108 (SEQ ID NO:16)
CLAVE	.*****:***** *:*****.***** *: :*** **::***	

Figura 4A

>Secuencia de nucleótidos de VH de 15C3: (SEQ ID NO: 21)
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCCGGAGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 GCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGCTATATGGTATAATGGAAGAAAACAAGACTATGCAGAC
 TCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
 GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGGGGAACTGGGTACAATT
 GGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Figura 4B

>Secuencia de aminoácidos de VH de 15C3: (SEQ ID NO: 22)
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCLVSGFTFS[SYGMH]WVRQAPGKGLEWVA[AIWYNGRKQDYAD]
 [SVKGR]FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTR[GTGYNWFD]WGQGLTVTVSS

Figura 4C

>Secuencia de nucleótidos de VL1 de 15C3: (SEQ ID NO: 23)
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
 CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCC
 AGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTT
 AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTT
 TGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGG
 TGGAAATCAAA

>Secuencia de nucleótidos de VL2 de 15C3: (SEQ ID NO: 24)
 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTATGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
 AAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
 TGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGAC
 TGGAGATTAAA

Figura 4D

>Secuencia de aminoácidos de VL1 de 15C3: (SEQ ID NO: 25)
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC[RA]SQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY[DASNRAT]GI PARF
 SGSGSGTDFLTITISSLEPEDFAVYYC[QQR]SNWPWT[FGQ]GTKVEIK

>Secuencia de aminoácidos de VL2 de 15C3: (SEQ ID NO: 26)
 AIQLTQSPSSLSASVGDRTVITC[RA]SQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIY[DASSLES]GVPSRF
 SGSGSGTDFLTITISSLPEDFATYYC[QQF]NSYPIT[FGQ]GTRLEIK

Figura 7

Alineaciones de secuencias de V_L de agentes de unión a CD3

VκI

27H5 (19) DILMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYFASSLQS¹GVPS CDR1 CDR2
 15C3 VL2 AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES²GVPS
 L4/18a AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES³GVPS
 .*. *****⁴*****⁵*****⁶*****⁷*****⁸.

27H5 (19) RFSGSGGTDTYTLTISLQPEDFATYYCQQYYST.LTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17)
 15C3 VL2 RFSGSGGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPITTFGQGRLEIK (SEQ ID NO:26)
 L4/18a RFSGSGGTDFLLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPITTFGQGRLEIK (SEQ ID NO:53)
 *****⁹. *****¹⁰*****¹¹*****¹²*****¹³*****¹⁴*****¹⁵*****¹⁶*****¹⁷*****¹⁸*****¹⁹

Secuencia 4 de unión a cadena kappa humana LTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:54)
 Secuencia 5 de unión a cadena kappa humana ITFGQGRLEIK (SEQ ID NO:55)

CDR3 ----- J -----

Figura 8

Alineaciones de sécuencias de V_L de agentes de unión a CD3

VκII		CDR1		CDR2
27H5 (13.17)	EIVLTQSPRTLSLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP
DPK22	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASSRATGIP
	*****	*****	*****	*****
		CDR3		

			J	
27H5	DRFSGSGGTDFLTISRLEDPEDFAVYCC	QQYGSSPIT	IFGQGRLEIK	(SEQ ID NO:16)
DPK22	DRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCC	QQYGSSP	-----	(SEQ ID NO:56)
	*****	*****	*****	*****
Secuencia 5 de unión a cadena kappa humana				
			ITFGQGRLEIK	(SEQ ID NO:57)

Figura 9A

Ensayo de unión a CD3

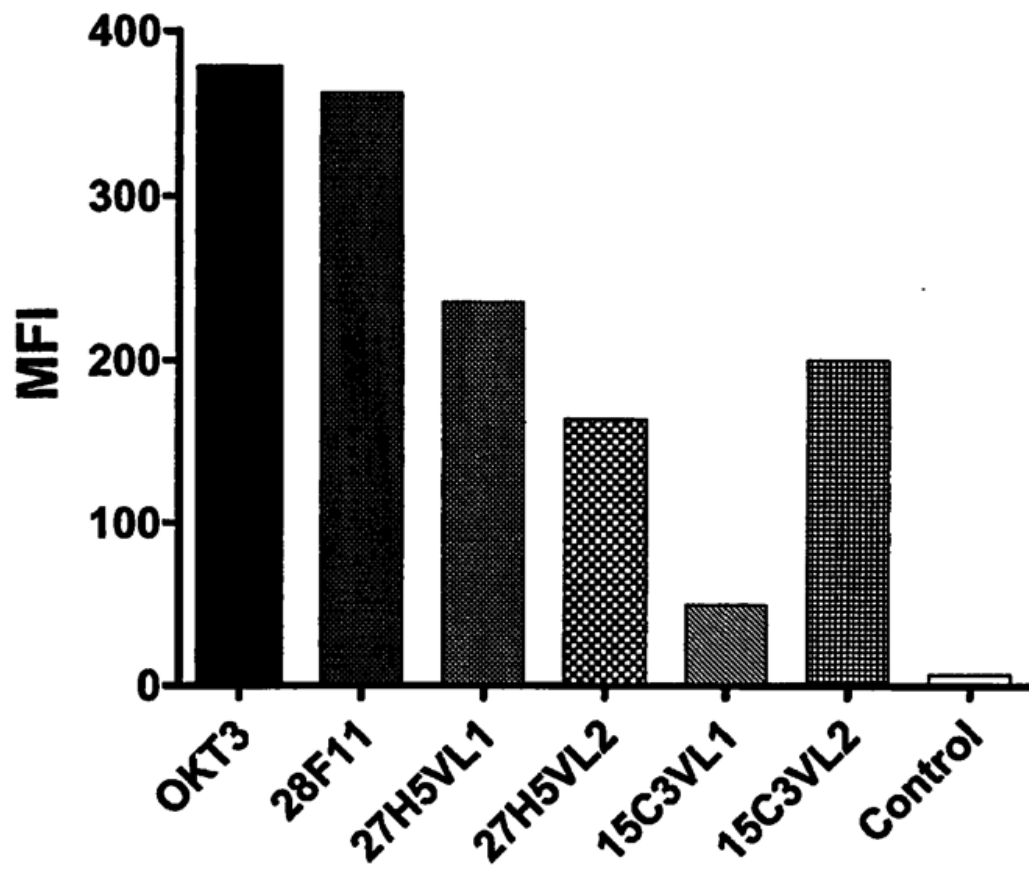


Figura 9B

Ensayo de competición de OKT3

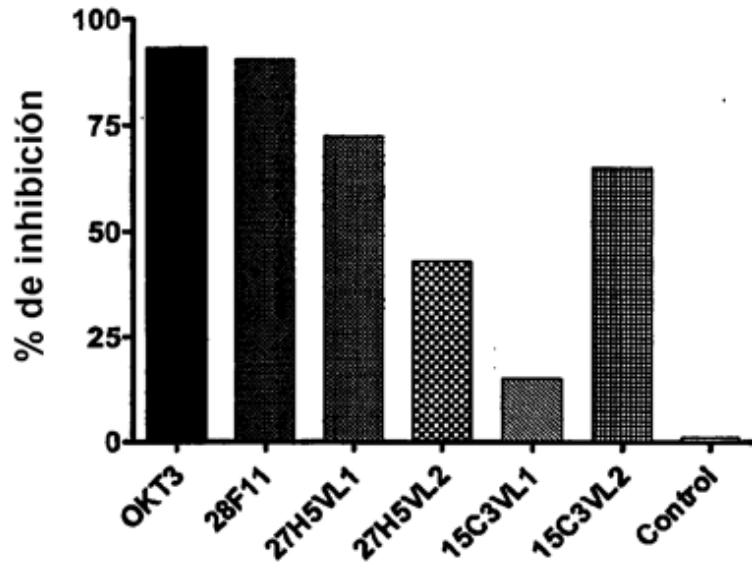


Figura 9C

Ensayo de modulación antigénica de CD3 y TCR

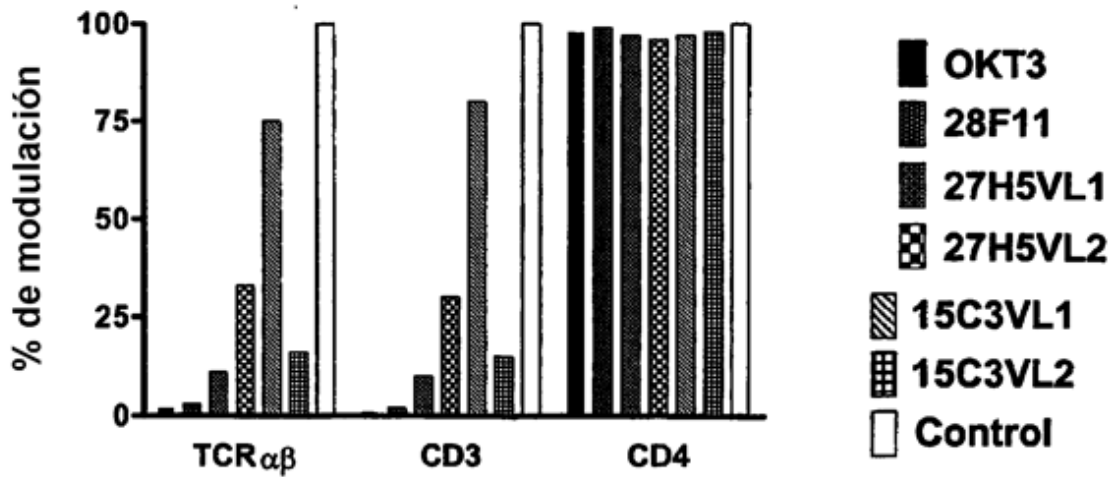


Figura 9D

Ensayo de proliferación de células T humanas

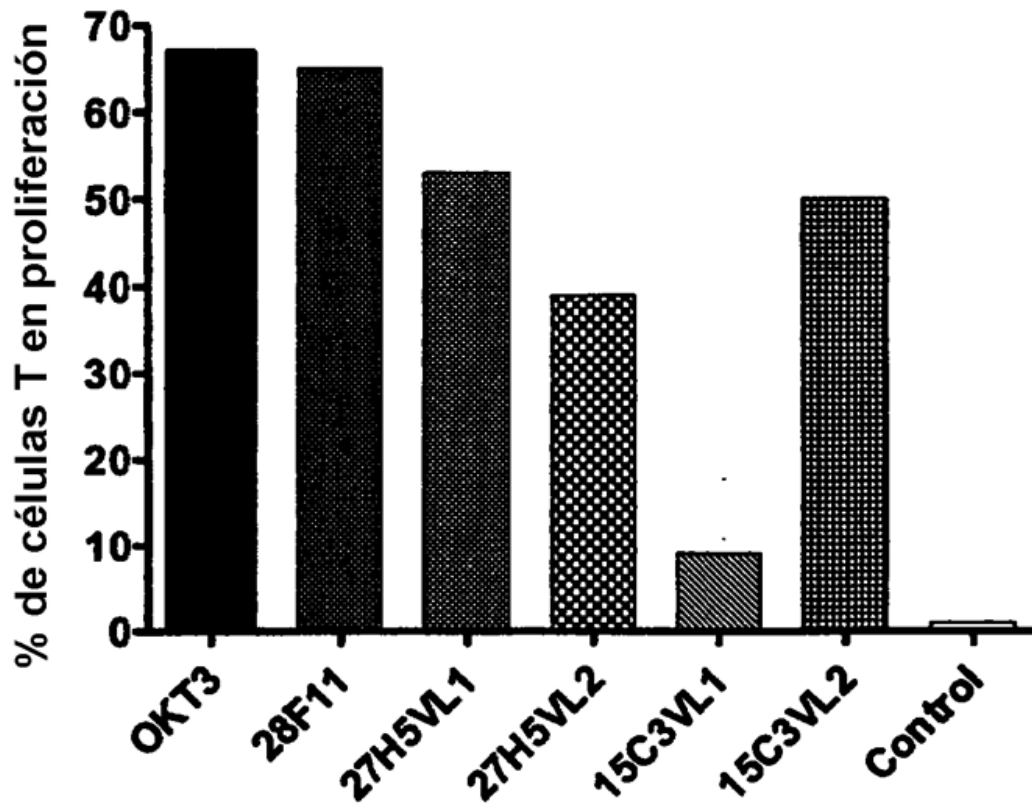


Figura 10

Matriz peptídica: péptidos solapantes que abarcan el dominio extracelular de CD3 ϵ humana

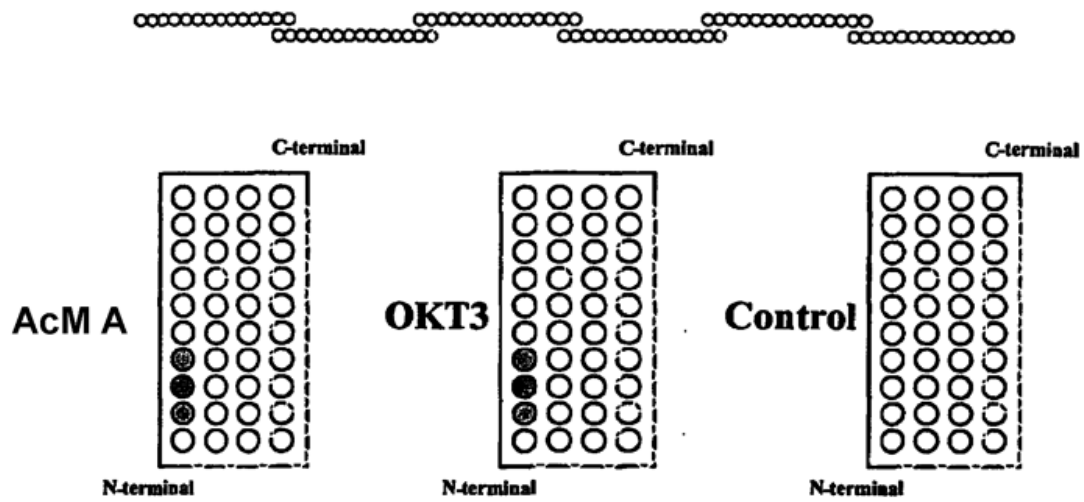


Figura 11A

Ensayo de liberación de TNF- α

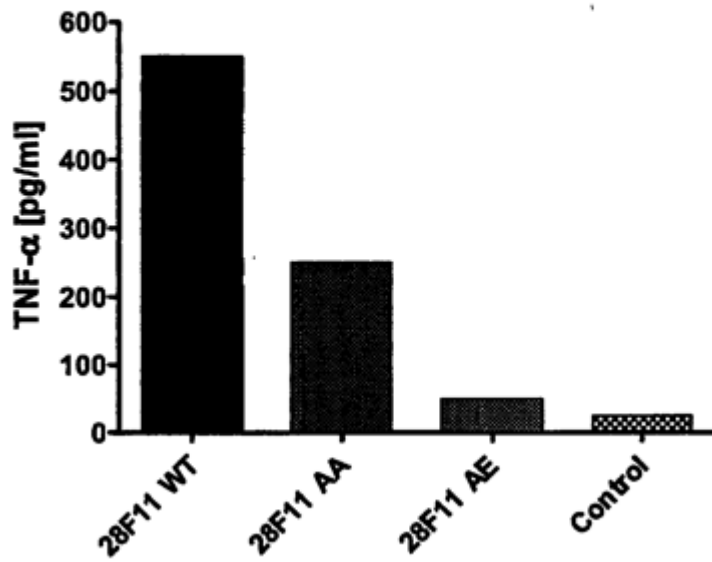


Figura 11B

Ensayo de liberación de IFN- γ

