

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 596**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2016** **E 16178648 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** **EP 3115376**

54 Título: **Anticuerpo que se une a CD3 humano**

30 Prioridad:

**10.07.2015 EP 15176355**

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

**12.12.2018**

73 Titular/es:

**MERUS N.V. (100.0%)**

**Yalelaan 62**

**3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**BAKKER, ALEXANDER BERTHOLD HENDRIK y**

**VAN LOO, PIETER FOKKO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 693 596 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

Anticuerpo que se une a CD3 humano

5 La invención se refiere al campo de los anticuerpos, en particular al campo de los anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos pueden ser utilizados en el tratamiento de humanos. Más en particular, la invención se refiere a anticuerpos y preferiblemente a anticuerpos biespecíficos para el tratamiento de un tumor.

10 Los anticuerpos monoclonales que se unen a CD3 humanos fueron algunos de los primeros anticuerpos desarrollados para uso terapéutico en humanos. Los anticuerpos monoclonales que se unen a CD3 humanos se usan típicamente por sus cualidades supresoras inmunitarias, por ejemplo, en el rechazo de trasplantes. Los anticuerpos que son biespecíficos para CD3 en linfocitos T y para un antígeno diana de superficie en células cancerosas, son capaces de conectar cualquier tipo de célula T a una célula cancerosa, independientemente de la especificidad del receptor de linfocitos T, la coestimulación o la presentación del antígeno peptídico. Dichos anticuerpos biespecíficos que acoplan linfocitos T son muy prometedores en el tratamiento de diversos cánceres y tumores neoplásicos.

15 El documento WO2014/051433 describe mAb para CD3 que son candidatos adecuados para servir como un bloque de construcción en la generación de anticuerpos biespecíficos que actúan como moléculas acopladoras de linfocitos T. Estos mAb para CD3 se denominan 3056 y 3896; las secuencias VH y VL de estos mAb se divulgan en la figura 22. Ambos mAb para CD3, 3056 y 3896, tienen buenas propiedades en términos de actividad funcional. Se unen a CD3/TCR expresado sobre superficie celular en líneas de linfocitos T humanos con una afinidad (KD) que es significativamente menor que la afinidad del anticuerpo anti-CD3 de ratón bien conocido, mOKT3, lo que resulta en una media de intensidad de fluorescencia menor en análisis citométrico de flujo sobre células CD3<sup>POS</sup>. De modo similar, cuando se inmovilizan sobre placas de cultivo de tejido, inducen proliferación de linfocitos T en un grado menor cuando se comparan con mOKT3.

20 Sin desear unirse a teoría alguna, se considera que una afinidad CD3 que es significativamente menor que la afinidad de mOKT3 se prefiere en un formato acoplador de linfocitos T biespecíficos. Se prefiere que el anticuerpo biespecífico se una a CD3 con una afinidad que sea menor que la afinidad de unión al antígeno tumoral. Sin unirse a teoría alguna, se considera que esta diferencia en la afinidad permite la opsonización preferencial de las células tumorales por el anticuerpo biespecífico y de esta manera se les marca para destrucción por células efectoras inmunitarias que incluyen células NK y/o linfocitos T presentes en las cercanías.

25 Los inventores han observado que los resultados obtenidos con el anticuerpo 3056 presentan variación lote a lote. Esto sorprendió a los inventores dado que la variabilidad no es un problema con el anticuerpo 15C3, el cual tiene la misma secuencia VH que el anticuerpo 3056 pero una cadena ligera diferente (descrita en el documento W02005/118635).

[Un objetivo de la invención es proporcionar una variante del anticuerpo 3056 con esencialmente las mismas propiedades de unión a CD3 en clase, no necesariamente en cantidad, con características mejoradas.

40 Resumen de la invención

La invención proporciona un anticuerpo que se une a CD3 humano cuyo anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera en la que dicha cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos:

45 QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGL E WVAAI  
 WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
 YNWF D PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sustituciones de aminoácidos o una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>; y otra diferente de las regiones CDR;

50 en la que

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

55 X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

$X_1 = H$  y  $X_2 = A$ ; y dicha cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera O12/IgV<sub>k</sub>1-39 de la figura 23 con 0-5 sustituciones de aminoácido.

Se describe una molécula de aminoácido que codifica una secuencia de aminoácidos:

5 QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI  
 WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
 YNWFDPWGQG TLVTV SS

con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones de aminoácidos, o una combinación de los mismos en una o más posiciones diferentes a la posición indicada por  $X_1X_2$ ;

en la que

$X_1 = N$  y  $X_2 = A$ ;

15  $X_1 = N$  y  $X_2 = T$ ;

$X_1 = S$  y  $X_2 = G$ ;

20  $X_1 = H$  y  $X_2 = G$ ;

$X_1 = D$  y  $X_2 = G$ ; o

$X_1 = H$  y  $X_2 = A$ .

25 La combinación  $X_1$  y  $X_2$  en un anticuerpo como se describe en este documento es preferiblemente  $X_1 = N$  y  $X_2 = A$ .

La invención proporciona además una célula que expresa el anticuerpo y/o comprende la molécula de ácido nucleico.

30 Un anticuerpo de la invención es, a menos que se especifique lo contrario, preferiblemente un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico se une preferiblemente al menos a CD3 humano. Además, el anticuerpo biespecífico se une preferiblemente al menos a una molécula de superficie que se expresa preferentemente en linfocitos tumorales humanos. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico se une a BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, EGFR, EGFRvIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HM1.24, MCSP o PSMA. En una realización más preferida, el anticuerpo biespecífico se une a CLEC12A.

35 Además, se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Además, se describe un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende además una marca, preferiblemente una marca para imágenes in vivo.

40 La invención también proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor o que corre el riesgo de tener un tumor que comprende administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. También se describe un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor o tiene riesgo de un tumor. Además, se describe el uso de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor o que tiene riesgo de un tumor. En una realización preferida, el tumor es un tumor CLEC12A positivo.

Descripción detallada de la invención

50 Un anticuerpo de la invención es preferiblemente un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico se une a al menos CD3 humano. Además, el anticuerpo biespecífico se une preferiblemente al menos a una molécula de superficie que se expresa en células tumorales humanas. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico se une a BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, EGFR, EGFRvIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HM1.24, MCSP o PSMA. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo biespecífico se une a CLEC12A.

60 BCMA también se conoce como Superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 17 (TNFRSF17); TNFRSF13A2; Antígeno de maduración de células B; BCM; Factor de maduración de células B; Proteína de maduración de células B; CD269 o antígeno CD269. Ids: HGNC: 11913; Entrez Gene: 608; Ensembl: ENSG0000048462; OMIM: 109545; UniProtKB: Q02223.

- CD19 también se conoce como Molécula CD19; Antígeno de superficie de linfocitos T Leu-12; Antígeno CD19; CVID3; Antígeno de diferenciación CD19; B4; Antígeno de superficie de linfocitos B B4; Antígeno de linfocitos B CD19. Ids: HGNC: 1633; Entrez Gene: 930; Ensembl: ENSG00000177455; OMIM: 107265; UniProtKB: P15391.
- 5 CD20 también se conoce como 4 dominios que abarcan la membrana, subfamilia A, miembro 1 (MS4A1); MS4A2; CD20; S7; Antígeno de Superficie de Leucocito Leu-16; Antígeno de linfocitos B CD20; Bp35; Antígeno B1 de la superficie celular de linfocitos B; Antígeno CD20; Receptor CD20; CVID5; Antígeno de superficie de linfocitos B B1; B1; Miembro de la subfamilia A de dominios 4 que abarca la membrana 1; LEU-16. Ids:
- 10 HGNC: 7315; Entrez Gene: 931; Ensembl: ENSG00000156738; OMIM: 112210; UniProtKB: P11836.
- CD30 también se conoce como Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral, Miembro 8 (TNFRSF8); Antígeno Ki-1; CD30; Ki-1; D1S166E; Receptor de citoquinas CD30; Antígeno de activación de linfocitos CD30; Miembro 8 de la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral; Receptor CD30L; Antígeno CD30. Ids: HGNC: 11923; Entrez Gene: 943; Ensembl: ENSG00000120949; OMIM: 153243; UniProtKB: P28908.
- 15 CD33 también se conoce como Molécula CD33; SIGLEC-3; Antígeno CD33 (Gp67); Antígeno de superficie celular mielóide; CD33; Lectina 3 similar a Ig de unión a Acido siálico; Siglec-3; SIGLEC3; Antígeno CD33 y gp67. Ids: HGNC: 1659; Entrez Gene: 945; Ensembl: ENSG00000105383; OMIM: 159590; UniProtKB: P20138.
- 20 CD38 también se conoce como Molécula CD38; T10; Antígeno CD38 (P45); Hidrolasa 1CADPr; ADP-Ribosil ciclasa 1; ADP-Ribosil ciclasa/ADP-Ribosa Hidrolasa cíclica; NAD (+) nucleosidasa; EC 3.2.2.5; ADP-Ribosa Hidrolasa 1 cíclica; Antígeno CD38. Ids: HGNC: 1667; Entrez Gene: 952; Ensembl: ENSG00000004468; OMIM: 107270; UniProtKB: P28907.
- 25 CD44 también se conoce como Molécula CD44 (Grupo Sanguíneo Indio); IN; MDU2; Antígeno CD44 (Sistema de Grupo Sanguíneo Indio); MDU3; CDW44; MIC4; CSPG8; Proteoglican 8 de sulfato de Condroitina; HCELL; Ligando de E- y L-selectina de células hematopoyéticas; MC56; Receptor de matriz extracelular III; Pgp1; Proteoglicano de Heparan sulfato; Glicoproteína de superficie celular CD44; Receptor de hialuronato; epican; Glicoproteína fagocítica 1; Función Homing y sistema de grupo sanguíneo indio; ECMR-III; CDW44; HUTCH-I; Epican; LHR; PGP-1; Antígeno CD44; PGP-I; receptor Homing de linfocitos CP90/de adhesión; Glicoproteína fagocítica I; Antígeno Hermes; HGNC: 1681; Entrez Gene: 960; Ensembl: ENSG00000026508; OMIM: 107269; UniProtKB: P16070.
- 30 CD123 también se conoce como Ciclo de División Celular 123; Homólogo de Ciclo de División Celular 123; C10orf7; Homólogo de proteína de ciclo de división celular 123; D123; Proteína D123; HT-1080; CCEP123; PZ32; CEP89; Homólogo del ciclo de división celular 123 (S. Cerevisiae); FLJ14640; Marco de lectura abierto 7 del cromosoma 10. Ids: HGNC: 16827; Entrez Gene: 8872; Ensembl: ENSG00000151465; OMIM: 615470; UniProtKB: 075794.
- 35 CD138 también se conoce como Sindecano 1 (SCD1); CD138; SDC; Receptor del factor de crecimiento del fibroblasto de proteoglicano de heparan sulfato; Proteoglicano 1 Sindecano; sindecano; SYND1; sindecano-1; Antígeno CD138. Ids: HGNC: 10658; Entrez Gene: 6382; Ensembl: ENSG00000115884; OMIM: 186355; UniProtKB: P18827.
- 40 CEA también se conoce como Molécula de Adhesión Celular 5 Relacionada con el Antígeno Carcinoembrionario (CEACAM5); Antígeno de meconio 100; CD66e; Antígeno carcinoembrionario; Antígeno CD66e. Ids: HGNC: 1817; Entrez Gene: 1048; Ensembl: ENSG00000105388; OMIM: 114890; UniProtKB: P06731.
- 45 CLEC12A también se conoce como familia del dominio de lectina tipo C-12, miembro A; Proteína de lectina de tipo C CLL-1; MICL; Lectina asociada a células dendríticas 2; Superfamilia de lectinas de tipo C; Receptor tipo lectina inhibitorio mielóide de tipo C; Molécula tipo 1 de lectina tipo C; CLL-1; DCAL2; CLL1; Molécula tipo 1 de lectina tipo C; DCAL-2; Lectina de células asesinas como receptor de la subfamilia L, miembro 1 (KLRL1); CD371 (Bakker A. et al. Cáncer Res. 2004, 64, p8843 50; GenBankTM acceso. No: AY547296; Zhang W. et al. GenBankTM acceso no: AF247788; AS Marshall, et al. J Biol Chem 2004, 279, p14792-802; GenBankTM acceso no: AY498550; Y. Han et al. Blood 2004, 104, p2858 66; H. Floyd, et al. GenBankTM acceso. No: AY426759; CHChen, et al. Blood 2006, 107, p1459 67). Ids: HGNC: 31713; Entrez Gene: 160364; Ensembl: ENSG00000172322; OMIM: 612088; UniProtKB: Q5QGZ9. CLEC12A es un antígeno que se expresa en las células blásticas leucémicas y en las células madre leucémicas en la leucemia mielóide aguda (AML), incluidas las células madre leucémicas de CD34 negativas o de baja expresión CD34 (población lateral) (AB Bakker et al. Cáncer Res 2004, 64, p8443 50; Van Rhenen et al. 2007 Blood 110: 2659; Moshaver et al. 2008 Stem Cells 26: 3059). Por otra parte, se cree que la expresión de CLEC12A está restringida al linaje hematopoyético, particularmente a las células mieloides en la sangre periférica y la médula ósea, es decir, granulocitos, monocitos y precursores de células dendríticas. Más importante aún, CLEC12A está ausente en las células madre hematopoyéticas. Este perfil de expresión hace de CLEC12A un objetivo particularmente favorable en la AML. La forma de longitud completa de CLEC12A comprende 275 residuos de aminoácidos, incluido un tramo intracelular adicional de 10 aminoácidos que está ausente en la mayoría de las otras isoformas, y muestra el perfil de expresión estrictamente mielóide (expresión en la superficie y nivel de ARNm). El término "CLEC12A o su equivalente funcional significa todas las variantes (como el empalme y la mutación) a las que se hace referencia anteriormente y sus isoformas que conservan el perfil de expresión mielóide estricto (tanto a nivel de expresión superficial como a nivel de ARNm) como se describe en Bakker et al. Cáncer Res 2004, 64, p8443-50 y Marshall 2004-J Biol Chem 279 (15), p14792-802. Un anticuerpo de unión a CLEC12A de la
- 50
- 55
- 60
- 65

invención se une a CLEC12A humano. Cuando aquí se hace referencia a CLEC12A, la referencia es a CLEC12A humano, a menos que se indique específicamente lo contrario.

CD3 (grupo de diferenciación 3). El correceptor de linfocitos T es un complejo de proteínas y está compuesto por cuatro cadenas distintas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$  y dos cadenas CD3 $\epsilon$ . Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de linfocitos T (TCR) y la cadena  $\zeta$ - para generar una señal de activación en los linfocitos T. Las moléculas TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , cadena  $\zeta$ - y CD3 juntas forman el complejo TCR. CD3 se expresa en los linfocitos T. Un anticuerpo que se une a CD3 puede unirse a una cadena CD3 $\gamma$ , una cadena CD3 $\delta$ , una cadena CD3 $\epsilon$  o una combinación de CD3 $\delta$ /CD3 $\epsilon$  o CD3 $\gamma$ /CD3 $\epsilon$ . El anticuerpo de unión a CD3 de la presente invención se une a la cadena CD3 $\epsilon$ . CD3 $\epsilon$  se conoce bajo varios alias, algunos de los cuales son: "Molécula CD3 $\epsilon$ , Épsilon (Complejo CD3-TCR)"; "Antígeno CD3 $\epsilon$ , Polipéptido de Épsilon (Complejo TIT3)"; Antígeno de superficie de linfocitos T T3/cadena Épsilon Leu-4; T3E; Complejo del receptor de antígeno de linfocitos T, subunidad de Épsilon de T3; Antígeno CD3 $\epsilon$ ; CD3-Épsilon 3; IMD18; TCRE. Los identificadores para el gen CD3E son HGNC: 1674; Entrez Gene: 916; Ensembl: ENSG00000198851; OMIM: 186830 y UniProtKB: P07766. Se ha demostrado que los anticuerpos de unión a CD3 biospecíficos que se dirigen a la cadena CD3 $\epsilon$  son efectivos en el reclutamiento de linfocitos T para células aberrantes. Por lo tanto, un anticuerpo (bienespecífico) de acuerdo con la presente invención contiene preferiblemente una combinación de cadena pesada/ligera que se une a CD3 $\epsilon$ . Un anticuerpo de unión a CD3 de la invención se une a CD3 humano. Cuando se hace referencia aquí a CD3, la referencia es a CD3 humano, a menos que se indique específicamente lo contrario.

CS-1 también se conoce como Citrato Sintasa; EC 2.3.3.1; Citrato Sintasa, Mitocondrial; EC 2.3.3. Ids: HGNC: 2422; Entrez Gene: 1431 Ensembl: ENSG00000062485; OMIM: 118950; UniProtKB: 075390.

EGFR también se conoce como receptor del factor de crecimiento epidérmico; homólogo de oncogén viral de Leucemia eritroblástica (V-Erb-B) (aviar); ERBB1; PIG61; Protooncogén C-ErbB-1; Homólogo de oncogén viral de leucemia Eritroblástica Aviar (V-Erb-B); Receptor tirosina-proteína quinasa ErbB-1; Proteína inhibidora del crecimiento celular 40; Proteína inductora de la proliferación celular 61; HER1; mENA; EC 2.7.10.1; EC 2.7.10; Receptor del factor de crecimiento epidérmico (Homólogo de oncogén viral de leucemia Eritroblástica Aviar (V-Erb-B)). Ids: HGNC: 3236; Entrez Gene: 1956; Ensembl: ENSG00000146648; OMIM: 131550; UniProtKB: P00533.

EGFRVIII es una variante común de EGFR (Oncogene. 2013 23 de mayo; 32 (21): 2670-81. doi: 10.1038/onc.2012.280. Epub 2012 16 de julio).

3 similar a Delta (DLL3) también se conoce como 3 similar a delta); Homólogo 3 Delta Drosophila; Delta3; 3 similar a Delta (Drosophila); SCDO1. Los Ids para DLL3 son: HGNC: 2909; Entrez Gene: 10683; Ensembl: ENSG00000090932; OMIM: 602768 y UniProtKB: Q9NYJ7.

LGR5 es un receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repetición rica en leucina. Los nombres alternativos para el gen o la proteína son receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repetición rica en leucina; receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repetición rica en leucina; Receptor Acoplado a Proteína G HG38; Receptor 49 acoplado A proteína G; Receptor 67 acoplado a proteína G; GPR67; GPR49; Receptor acoplado a la proteína G huérfana HG38; Receptor 49 acoplado a proteína G; GPR49; HG38 y FEX. Una proteína o anticuerpo de la invención que se une a LGR5, se une a LGR5 humano. La proteína de unión a LGR5 o el anticuerpo de la invención, debido a la secuencia y la similitud de la estructura terciaria entre los ortólogos humanos y otros mamíferos, también se unen a dicho ortólogo, pero no necesariamente así. Los números de acceso a la base de datos de la proteína LGR5 humana y el gen que la codifica son (NC\_000012.12; NT\_029419.13; NC\_018923.2; NP\_001264155.1; NP\_001264156.1; NP\_003658.1).

MSLN o mesotelina también se conoce como mesotelina; Factor de potenciación de pre-pro-megacariocitos; Antígeno CAK1; MPF; proteína relacionada con mesotelina MPF soluble; Factor Potenciador de Megacariocitos y SMRP. Los Ids para MSLN son: HGNC: 7371; Entrez Gene: 10232; Ensembl: ENSG00000102854; OMIM: 601051; UniProtKB: Q13421.

El receptor de folato 1 también se conoce como FOLR1; Receptor de folato 1 Receptor de folato 1; Antígeno asociado a tumor ovárico MOv18; Proteína de unión a folato de adultos; Receptor de Folato, Adulto; células KB FBP; FR-alfa; FOLR; FBP; Proteína de unión a folato; y Receptor de Folato 1. Los Ids para FOLR1 son HGNC: 3791; Entrez Gene: 2348; Ensembl: ENSG00000110195; OMIM: 136430; UniProtKB: P15328

El receptor 3 de folato también se conoce como FOLR3; Receptor de Folato 3 (Gamma); FR-Gamma; Receptor de Folato 3; Gamma-HFR; y FR-G. Los Ids para FOLR3 son HGNC: 3795; Entrez Gene: 2352; Ensembl: ENSG00000110203; OMIM: 602469; y UniProtKB: P41439.

EPCAM también se conoce como Molécula de Adhesión Celular Epitelial; EGP40; M4S1; ESA; MIC18; KS1/4; Transductor de señal de calcio asociado a tumor 1; MK-1; TACSTD1; Glicoproteína 2 epitelial humana; TROP1; Componente de membrana, cromosoma 4, marcador de superficie (glicoproteína 35 kD); Antígeno asociado a adenocarcinoma; EGP; Glicoproteína de superficie celular Trop-1; Ep-cam; Glicoproteína epitelial 314; GA733-2; Proteína asociada al tumor gastrointestinal principal GA733-2; M1S2; EGP314; Antígeno CD326; KSA; Antígeno de superficie de células epiteliales; DIAR5; Glicoproteína epitelial; HNPCC8; hEGP314; Antígeno Ids por el anticuerpo monoclonal AUA1; KS 1/4 antígeno;

EGP-2; ACSTD1. Ids: HGNC: 11529; Entrez Gene: 4072; Ensembl: ENSG00000119888; OMIM: 185535; UniProtKB: P16422.

5 HER2 también se conoce como homólogo de oncogén viral de leucemia eritroblástica aviar V-Erb-B2 2; ERBB2; CD340; NGL; HER-2; HER-2/neu2; NEU2; TKR1; homólogo de oncogén derivado de Neuro/glioblastoma; Proteína C-Erb B2/Neu; Proteína del gen 19 del nodo linfático metastásico; herstatin; Protooncogén C-ErbB-2; homólogo de oncogén derivado de Neuroblastoma/glioblastoma; Protooncogén neu; Receptor tirosina-proteína quinasa ErbB-2; Receptor de superficie celular de tipo tirosina quinasa HER2; Homólogo de oncogén viral de Leucemia eritroblástica V-Erb-B2 2, homólogo de oncogén derivado de neuro/glioblastoma; MLN 19; MLN19; p185erbB2; Antígeno CD340; EC 2.7.10.1; EC 2.7.10; Homólogo de oncogén viral de Leucemia eritroblástica aviar V-Erb-B2 2 (homólogo de oncogén derivado de neuro/glioblastoma). Ids: HGNC: 3430; Entrez Gene: 2064; Ensembl: ENSG00000141736; OMIM: 164870; UniProtKB: P04626.

15 HM1.24 también se conoce como BST2; Antígeno 2 de células estromales de médula ósea; TETHERIN; BST-2; Antígeno estromal de médula ósea 2; Antígeno HM1.24; Tetherin; CD317; Antígeno CD317; NPC-A-7. Ids: HGNC: 1119; Entrez Gene: 684; Ensembl: ENSG00000130303; OMIM: 600534; UniProtKB: Q10589.

20 MCSP también se conoce como proteína rica en cisteína asociada a mitocondrias de esperma (SMCP); MCSP; MCS; selenoproteína de Cápsula mitocondrial; HSMCSGEN1; Proteína rica en cisteína asociada a mitocondrios de esperma. Ids: HGNC: 6962; Entrez Gene: 4184; Ensembl: ENSG00000163206; OMIM: 601148; UniProtKB: P49901.

25 La PSMA también se conoce como folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de la próstata) 1; FOLH1; NAALAD1; FOLH; mGCP; Glutamato carboxipeptidasa II; Dipeptidasa ácida I ligada a alfa N-acetilada; PSM; NAALADAsA I; PSMA; EC 3.4.17.21; Glutamato Carboxilasa II; GCP2; Proteína del gen 27 que inhibe el crecimiento celular; NAALAdasa; Foliipoli-Gamma-Glutamato Carboxipeptidasa; Glutamato carboxipeptidasa 2; Membrana glutamato carboxipeptidasa; Dipeptidasa ácida ligada a alfa N-acetilada 1; Pteroilpoli-Gamma-Glutamato Carboxipeptidasa; Variante de antígeno de membrana específica de próstata F; FGCP; Folato hidrolasa 1; GCPII; Antígeno de membrana específico de la próstata. Ids: HGNC: 3788; Entrez Gene: 2346; Ensembl: ENSG00000086205; OMIM: 600934; UniProtKB: Q04609.

30 PSMA no debe confundirse con la Subunidad Proteasoma (Prosome, Macropain), Tipo Alfa, 1, que también se conoce con el alias PSMA1.

35 Los números de acceso se proporcionan principalmente para proporcionar un método adicional de identificación de un objetivo, la secuencia real de la proteína unida puede variar, por ejemplo, debido a una mutación en el gen codificador, como las que ocurren en algunos tipos de cáncer o similares. El sitio de unión al antígeno se une al antígeno y a una variedad de variantes del mismo, como las expresadas por algunas células inmunes o tumorales positivas para el antígeno.

40 Cuando en este documento se hace referencia a un gen, una proteína, la referencia es preferiblemente a la forma humana del gen o proteína. Cuando se hace referencia en este documento a un gen o proteína, se hace referencia al gen o proteína natural y a formas variantes del gen o proteína como puede detectarse en tumores, cánceres y similares, preferiblemente como puede detectarse en tumores humanos, cánceres y similares.

45 Un anticuerpo biespecífico de la invención se une preferiblemente al BCMA humano, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, EGFR, EGFRVIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HM1.24, MCSP, proteína PSMA o una variante de los mismos. No hace falta decir que la combinación de cadena pesada/ligera de unión a antígeno preferiblemente se une a la parte extracelular del antígeno. Un anticuerpo biespecífico según la invención se une preferiblemente a CLEC12A humano o una variante del mismo. Un anticuerpo biespecífico preferido según la invención se une a CD3 humano y CLEC12A humano o una variante de los mismos.

50 HGNC significa el comité de nomenclatura del gen HUGO. El número que sigue a la abreviatura es el número de acceso con el que la información sobre el gen y la proteína codificada por el gen se puede recuperar de la base de datos HGNC. Entrez Gene proporciona el número de acceso o el ID del gen con el que la información sobre el gen o la proteína codificada por el gen se puede recuperar de la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica). Ensemble proporciona el número de acceso con el que la información sobre el gen o la proteína codificada por el gen se puede obtener de la base de datos de Ensemble. Ensembl es un proyecto conjunto entre EMBL-EBI y el Instituto Wellcome Trust Sanger para desarrollar un sistema de software que produce y mantiene la anotación automática en genomas eucarióticos seleccionados.

60 La invención proporciona un anticuerpo que se une a CD3 humano cuyo anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera en la que dicha cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLV WVAAI  
 WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
 YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>; y diferente de las regiones CDR;

5

en donde

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

10

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

15

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A; y dicha cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera O12/IgVk1-39 de la figura 23 A con 0-5 sustituciones de aminoácido.

20

También se describe una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de un segmento del gen O12/IgVk1-39\*01 como se muestra en la figura 23A con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de los mismos. La frase "cadena ligera O12" se utilizará en toda la memoria descriptiva como abreviatura para "una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de un segmento del gen O12/IgVk1-39\*01 como se muestra en la figura 23A con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de los mismos. IgVk1-39 es la abreviatura del gen variable de inmunoglobulina Kappa 1-39. El gen también se conoce como Inmunoglobulina Kappa Variable 1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a u O12. Los ides externos para el gen son HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. En la figura 23A se proporciona una secuencia de aminoácidos preferida para IgVk1-39. Esto lista la secuencia de la región V. La región V se puede combinar con una de las cinco regiones J. Las Figuras 23B y 23C describen dos secuencias preferidas para IgVk1-39 en combinación con una región J. Las secuencias unidas se indican como IGKV1-39/jk1 e IGKV1-39/jk5; los nombres alternativos son IgVk1-39\*01/IGJk1\*01 o IgVk1-39\*01/IGJk5\*01 (nomenclatura de acuerdo con la base de datos de IMGT en la red mundial en [imgt.org](http://imgt.org)). Se prefiere que el O12/IgVk1-39\*01 que comprende la región variable de la cadena ligera sea una secuencia de línea germinal. Además, se prefiere que IGJk1\*01 o IGJk5\*01 que comprenden una región variable de cadena ligera sea una secuencia de línea germinal. En una realización preferida, las regiones variables de la cadena ligera IGKV1-39/jk1 o IGKV1-39/jk5 son secuencias de la línea germinal.

25

30

35

En una realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende una línea germinal O12/IgVk1-39\*01. En una realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la cadena ligera kappa IgVk1-39\*01/IGJk1\*01 o IgVk1-39\*01/IGJk5\*01. En una realización preferida, un IgVk1-39\*01/IGJk1\*01. La región variable de la cadena ligera comprende preferiblemente una cadena ligera kappa de línea germinal IgVk1-39\*01/IGJk1\*01 o una cadena ligera kappa de línea germinal IgVk1-39\*01/IGJk5\*01, preferiblemente una línea germinal IgVk1-39\*01/IGJk1\*01.

40

45

Las células B maduras que producen un anticuerpo con una cadena ligera O12 a menudo producen una cadena ligera que ha sufrido una o más mutaciones con respecto a la secuencia de la línea germinal, es decir, la secuencia normal en células no linfoides del organismo. El proceso que es responsable de estas mutaciones se denomina a menudo como (hiper)mutación somática. La cadena ligera resultante se denomina cadena ligera madurada por afinidad. Dichas cadenas ligeras, cuando se derivan de una secuencia de la línea germinal O12, son cadenas ligeras derivadas de O12. En esta especificación, la frase "Cadenas ligeras O12" incluirá cadenas ligeras derivadas de O12. Las mutaciones que se introducen por hipermutación somática también pueden introducirse artificialmente en el laboratorio. En el laboratorio también se pueden introducir otras mutaciones sin afectar las propiedades de la cadena ligera en clase, no necesariamente en cantidad. Una cadena ligera es al menos una cadena ligera O12 si comprende una secuencia como se muestra en la figura 23A, la figura 23B o la figura 23C con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de las mismas. En una realización preferida, la cadena ligera O12 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se muestra en la figura 23A, la figura 23B o la figura 23C con 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 Inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de los mismos. En una realización preferida, la cadena ligera O12 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se muestra en la figura 23A, la figura 23B o la figura 23C con 0-5, preferiblemente 0-4, más preferiblemente 0-3 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de los mismos. En una realización preferida, la cadena ligera O12 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se muestra en la figura 23A, la figura 23B o la figura 23C con 0-2, más preferiblemente 0-1, lo más preferiblemente 0 inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de las mismas. En una realización preferida, la cadena ligera O12 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se representa en la figura 23A o la figura 23B con las inserciones, supresiones,

55

60

sustituciones, adiciones de aminoácidos mencionadas o una combinación de las mismas. En una realización preferida, la cadena ligera comprende la secuencia de la figura 23B.

5 El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico tiene preferiblemente una combinación de región variable de cadena pesada/región variable de cadena ligera (VH/VL) que se une a CD3 y una segunda combinación de VH/VL que se une a un antígeno distinto de un antígeno en CD3. En una realización preferida, el antígeno es un antígeno tumoral. En una realización preferida, el VL en dicha primera combinación VH/VL es similar al VL en dicha segunda combinación VH/VL. En una realización más preferida, las VL en la primera y segunda combinaciones de VH/VL son idénticas. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa que tiene una combinación de cadena pesada/ligera (H/L) que se une a CD3 y una combinación de cadena H/L que se une a otro antígeno, preferiblemente un antígeno tumoral. En una realización preferida, la cadena ligera en dicha primera combinación de cadena H/L es similar a la cadena ligera en dicha segunda combinación de cadena H/L. En una realización más preferida, las cadenas ligeras en la primera y segunda combinaciones de cadenas H/L son idénticas, es decir, una cadena ligera humana similar o idéntica es una denominada "cadena ligera común", que es una cadena ligera que se puede combinar con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios funcionales de unión a antígeno. En una realización preferida, la cadena ligera en dicha primera combinación de cadena H/L comprende una región variable de cadena ligera que es similar a la región variable de cadena ligera en dicha segunda combinación de cadena H/L. En una realización más preferida, las regiones variables de la cadena ligera en la primera y segunda combinaciones de cadenas H/L son idénticas, es decir, una región variable de la cadena ligera humana similar o idéntica es una denominada "región variable de la cadena ligera común", que es una región variable de la cadena ligera que se puede combinar con diferentes regiones variables de la cadena pesada para formar anticuerpos con dominios funcionales de unión a antígeno. La cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera común es preferiblemente una cadena ligera común. La cadena ligera comprende preferiblemente una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de un segmento del gen O12/IgVκ1-39\*01 como se muestra en la figura 23A con 0-5 sustituciones de aminoácido, como se define más adelante en este documento. Preferiblemente, la cadena ligera común tiene una secuencia de línea germinal. Una secuencia de línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se usa frecuentemente en el repertorio humano y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad. Una cadena ligera de la línea germinal preferida es O12 como se indica aquí anteriormente. En la figura 23A se proporciona una secuencia preferida para O12/IgVκ1-39. Esto lista la secuencia de la región V. Las figuras 23B y 23C describen dos secuencias preferidas para IgVκ1-39 en combinación con una región J. Las secuencias unidas se indican como IGKV1-39/jk1 e IGKV1-39/jk5; los nombres alternativos son IgVκ1-39\*01/IGJk1\*01 o IgVκ1-39\*01/IGJk5\*01.

35 Se prefiere que la región variable de luz O12/IgVκ1-39\*01 sea una secuencia de línea germinal. Se prefiere que el O12/IgVκ1-39\*01 que comprende la región variable de la cadena ligera es una secuencia de línea germinal. Además, se prefiere que el IGJk1\*01 o/IGJk5\*01 que comprende la región variable de la cadena ligera sea una secuencia de línea germinal. En una realización preferida, las regiones variables de la cadena ligera IGKV1-39/jk1 o IGKV1-39/jk5 son secuencias de la línea germinal. La cadena ligera O12 del anticuerpo biespecífico es preferiblemente una cadena ligera O12 como se indica aquí anteriormente.

40 Un antígeno tumoral se define por el patrón de su expresión. Un antígeno específico del tumor, típicamente está presente solo en las células de un tumor y no en ninguna otra célula en el cuerpo humano postnatal, preferiblemente de adulto. Un antígeno asociado a un tumor suele estar presente en las células de un tumor y también en algunas células normales en el cuerpo humano postnatal, preferiblemente adulto. Un antígeno tumoral como se usa en el presente documento es típicamente un antígeno específico de tumor o asociado a un tumor. Los antígenos tumorales pueden estar involucrados en el proceso oncogénico o no. Puede ser diferente de la proteína "normal" en individuos sanos o no. Se observa que posteriormente se demostró que varios antígenos específicos del tumor se expresaban también en algunas otras células no tumorigénicas. Los antígenos tumorales preferidos son antígenos tumorales que se expresan en la superficie celular y que tienen una parte extracelular. El anticuerpo se une típicamente a una parte extracelular del antígeno.

50 El término "anticuerpo", como se usa en este documento, significa una molécula proteica que pertenece a la clase de proteínas de inmunoglobulina, que contiene uno o más dominios que se unen a un epítipo en un antígeno, donde dichos dominios se derivan de o comparten una homología de secuencia con la región variable de un anticuerpo. Los anticuerpos suelen estar formados por unidades estructurales básicas, cada una con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Los anticuerpos para uso terapéutico son preferiblemente tan cercanos a los anticuerpos naturales del sujeto a tratar como sea posible (por ejemplo, anticuerpos humanos para sujetos humanos). La unión del anticuerpo puede expresarse en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítipo del mismo está unido específicamente por el dominio de unión. La afinidad es una medida de la fuerza de unión a un antígeno o epítipo particular. La unión o "reconocimiento específico" se define como la unión con afinidades (KD) de al menos  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M o al menos  $1 \times 10^{-9}$  M. Los anticuerpos para aplicaciones terapéuticas pueden tener afinidades de  $1 \times 10^{-10}$  M o incluso superior. Los anticuerpos de la presente invención son típicamente anticuerpos biespecíficos y de la subclase de IgG humana. Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención son de la subclase de IgG1 humana. Lo más preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención son moléculas de IgG de longitud completa. La invención también proporciona un derivado y/o análogo de un anticuerpo de la invención. Dicho derivado y/o análogo tiene los dominios VH/VL de un anticuerpo de la invención, incluyendo preferiblemente la región variable de cadena ligera común como se define en otra parte en este documento. Los derivados adecuados son fragmentos Fv de cadena simple,

monocuerpos, VHH y fragmentos Fab. Los derivados pueden fusionarse al dominio C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 de una cadena pesada de un anticuerpo. El derivado preferiblemente comprende además el dominio C<sub>H</sub>1 de un anticuerpo pesado y el dominio C<sub>L</sub> de una cadena ligera de un anticuerpo. El derivado también puede estar en un formato multivalente, preferiblemente un formato biespecífico en el que uno de los dominios VH/VL de un anticuerpo comprende una combinación de región variable de cadena pesada/región variable de cadena ligera (VH/VL) que se une a CD3 de la invención y al menos otro dominio VH/VL de un anticuerpo que se une a un antígeno que no es un antígeno CD3. El al menos otro dominio VH/VL de un anticuerpo preferiblemente se une a un antígeno tumoral, preferiblemente CLEC12A. Los formatos multivalentes se producen fácilmente, por ejemplo, al producir el derivado como una proteína de fusión con o sin el enlazador peptídico o espaciador adecuado y/o convencional entre los dominios VH/VL.

Un "anticuerpo biespecífico" es un anticuerpo como se describió aquí anteriormente que comprende una combinación de región variable de cadena pesada/región variable de cadena ligera (VH/VL) que se une a CD3 y una segunda combinación de VH/VL que se une a un antígeno distinto de CD3, preferiblemente un antígeno tumoral. En una realización preferida, el VL en dicha primera combinación VH/VL es similar al VL en dicha segunda combinación VH/VL. En una realización más preferida, las VL en la primera y segunda combinaciones de VH/VL son idénticas. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa que comprende una combinación de cadena pesada/ligera que se une a CD3 y una combinación de cadena pesada/ligera que se une a otro antígeno, preferiblemente un antígeno tumoral. La unión de la combinación de la cadena pesada/ligera al antígeno se logra a través del sitio de unión del antígeno en la región variable de la combinación de la cadena pesada/ligera.

La invención también proporciona formatos biespecíficos alternativos, tales como los descritos en Spiess, C., et al., (Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol. Immunol. (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>). Los formatos de anticuerpos biespecíficos que no son anticuerpos clásicos con dos combinaciones H/L, tienen al menos un dominio variable que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de la invención. Este dominio variable puede estar vinculado a un fragmento Fv de una sola cadena, monocuerpo, un VHH y un fragmento Fab que proporciona la segunda actividad de unión.

El término anticuerpo biespecífico puede reemplazarse por el término más amplio "una proteína de unión biespecífica que comprende un dominio variable de inmunoglobulina que se une a CD3 que tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de la invención; y un (poli)péptido de unión a antígeno que se une a otro antígeno. En esta realización, el (poli)péptido de unión es preferiblemente un (poli)péptido como se especifica en Spiess et al (supra). En un anticuerpo biespecífico de la invención, la cadena ligera en la combinación de cadena H/L de unión a CD3 es preferiblemente similar a la cadena ligera en la combinación de cadena H/L que puede unirse a un antígeno distinto de CD3, preferiblemente un antígeno tumoral. En una realización más preferida, la cadena ligera en ambas combinaciones de cadena H/L es idéntica, es decir, dicha cadena ligera humana es la llamada "cadena ligera común", que es una cadena ligera que puede combinarse con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios funcionales de unión al antígeno. Preferiblemente, la cadena ligera común tiene una secuencia de línea germinal. Una secuencia de línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se usa frecuentemente en el repertorio humano y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad. Una cadena ligera de la línea germinal preferida es O12, la cadena germinal kappa humana reordenada IgVk1-39\*01/IGJk1\*01 o un fragmento o un equivalente funcional (es decir, el mismo segmento del gen IgVk1-39 pero diferente segmento del gen IGJk) del mismo (nomenclatura según a la base de datos mundial de IMGT en [imgt.org](http://imgt.org)).

El término "cadena ligera común", como se usa en el presente documento, se refiere a las dos cadenas ligeras (o la parte VL de la misma) en el anticuerpo biespecífico. Las dos cadenas ligeras (o la parte VL de la misma) pueden ser idénticas o tener algunas diferencias de secuencia de aminoácidos, mientras que la especificidad de unión del anticuerpo de longitud completa no se ve afectada. Está, por ejemplo, dentro del alcance de la definición de cadenas ligeras comunes como se usa en este documento, preparar o encontrar cadenas ligeras que no son idénticas pero aún funcionalmente equivalentes, por ejemplo, al introducir y probar cambios de aminoácidos conservadores, cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen o solo contribuyen en parte a la especificidad de unión cuando se empareja con la cadena pesada, y similares. Los términos "cadena ligera común", "VL común", "cadena ligera única", "VL única", con o sin la adición del término "reorganizado" se usan aquí de manera intercambiable.

Preferiblemente, la cadena ligera común tiene una secuencia de línea germinal. Una secuencia de línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se usa frecuentemente en el repertorio humano. Una cadena ligera de la línea germinal preferida es O12, preferiblemente la cadena germinal kappa humana reordenada IgVk1-39\*01/IGJk1\*01 o un fragmento o un equivalente funcional (es decir, el mismo segmento del gen IgVk1-39 pero diferente segmento del gen IGJk) del mismo (nomenclatura según la base de datos IMGT de la red mundial en [imgt.org](http://imgt.org)). Los términos cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVk1-39\*01/IGJk1\*01, IGKV1-39/IGKJ1, cadena ligera huVk1-39 o, en pocas palabras, huVk1-39 se usan de manera intercambiable en toda la solicitud. Obviamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena ligera de los cuales la secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena ligera en la que están presentes mutaciones (supresiones, sustituciones, inserciones y/o adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales. La cadena ligera de la presente invención también puede ser una cadena ligera como se especifica aquí anteriormente, que tiene 0-5 sustituciones de aminoácido.

Un anticuerpo de la invención es preferiblemente un anticuerpo IgG, preferiblemente un anticuerpo IgG1. El término "IgG de longitud completa" según la invención se define como que comprende una IgG esencialmente completo, que sin embargo no tiene necesariamente todas las funciones de una IgG intacta. Para evitar dudas, una IgG de longitud completa contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras. Cada cadena contiene regiones constantes (C) y variables (V), que pueden dividirse en dominios designados como CH1, CH2, CH3, VH y CL, VL. Un anticuerpo IgG se une al antígeno a través de los dominios de la región variable contenidos en la porción Fab, y después de la unión puede interactuar con las moléculas y las células del sistema inmunitario a través de los dominios constantes, principalmente a través de la porción Fc. Los anticuerpos de longitud completa según la invención abarcan moléculas de IgG en las que pueden estar presentes mutaciones que proporcionan las características deseadas. La IgG de longitud completa no debe tener supresiones de porciones sustanciales de ninguna de las regiones. Sin embargo, las moléculas de IgG en las que se eliminan uno o varios residuos de aminoácidos, sin alterar esencialmente las características de unión de la molécula de IgG resultante, se incluyen dentro del término "IgG de longitud completa". Por ejemplo, tales moléculas de IgG pueden tener una supresión de entre 1 y 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente en regiones sin CDR, en donde los aminoácidos eliminados no son esenciales para la especificidad de unión de la IgG.

Los anticuerpos IgG de longitud completa se utilizan debido a su vida media favorable y al deseo de permanecer lo más cerca posible de las moléculas totalmente autólogas (humanas) por razones de inmunogenicidad. IgG1 se favorece en base a su larga vida media circulatoria en el hombre. Con el fin de prevenir o evitar la inmunogenicidad en seres humanos, se prefiere que el anticuerpo IgG de longitud completa biespecífico de acuerdo con la invención sea una IgG1 humana. El término "biespecífico" significa que una combinación de cadena pesada y ligera (combinación H/L) o brazo del anticuerpo se une a un primer antígeno, mientras que la otra combinación H/L u otro brazo se une a un segundo antígeno, en donde dicho primero y segundo antígenos no son idénticos. Un antígeno, es típicamente una molécula que sirve como un objetivo para un anticuerpo. En la presente invención, se prefiere que un antígeno sea una proteína expresada en la membrana de una célula de un individuo. De acuerdo con la presente invención, dichos primer y segundo antígenos están en dos moléculas diferentes que se localizan preferiblemente en dos tipos de células diferentes. El término "un brazo [del anticuerpo]" significa preferiblemente la combinación de cadena pesada/cadena ligera que comprende una porción Fab de un anticuerpo IgG de longitud completa. Los anticuerpos biespecíficos que median la citotoxicidad reclutando y activando las células inmunes endógenas son una clase emergente de terapias de anticuerpos de próxima generación. Esto se puede lograr combinando especificidades de unión a antígeno para células diana (es decir, linfocitos Tumorales) y células efectoras (es decir, linfocitos T, células NK y macrófagos) en una molécula (Cui et al. JBC 2012 (287) 28206 28214; Kontermann, MABS 2012 (4) 182 197; Chames y Baty, MABS 2009 (1) 539 547; Moore et al. Blood 2011 (117) 4542 4551; Loffler et al. 2000 Blood 95: 2098; Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163:1246). Según la invención, se proporcionan anticuerpos biespecíficos en los que una combinación de cadena pesada/ligera se une al antígeno CLEC12A en células aberrantes (tumorales), mientras que la segunda combinación de cadena pesada/ligera se une a CD3 en células efectoras inmunes.

La invención proporciona anticuerpos IgG biespecíficos en los que una combinación de cadena pesada/ligera reconoce específicamente CLEC12A o un equivalente funcional del mismo, incluidos aquellos equivalentes funcionales de CLEC12A que carecen del tramo intracelular adicional mencionado anteriormente de 10 aminoácidos. Se prefiere un anticuerpo IgG biespecífico en el que una combinación de cadena pesada/ligera se une a la forma de longitud completa de CLEC12A. No hace falta decir que la combinación de cadena pesada/ligera de unión al antígeno tumoral se une a la parte extracelular del antígeno tumoral.

Los términos "dominio de región variable", "región variable", "dominio variable", "par VH/VL", "VH/VL", "VH", "VL", "porción Fab", "brazo Fab", "Fab" o "brazo" se usan aquí de manera intercambiable.

La unión al antígeno por un anticuerpo suele medirse a través de las regiones de complementariedad del anticuerpo y la estructura tridimensional específica del antígeno y el dominio variable, lo que permite que estas dos estructuras se unan con precisión (una interacción similar a un candado y una llave), en oposición a la adherencia aleatoria, no específica de anticuerpos. Como un anticuerpo reconoce típicamente un epítipo de un antígeno, y como tal, el epítipo también puede estar presente en otras proteínas, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención que se unen a CD3 o CLEC12A también pueden reconocer otras proteínas, si tales otras proteínas contienen el mismo epítipo. Por lo tanto, el término "unión" no excluye la unión de los anticuerpos a otra proteína o proteína(s) que contienen el mismo epítipo. Una combinación de cadena pesada/ligera que se une a CD3 en el anticuerpo de la invención no se une a otras proteínas en la membrana de las células en un humano post natal, preferiblemente adulto. Una combinación de cadena pesada/ligera que se une a CLEC12A de la invención no se une a otras proteínas en la membrana de las células en un humano postnatal, preferiblemente adulto.

Un anticuerpo biespecífico según la presente invención que se une a CD3 y un antígeno tumoral se une a CD3 (preferiblemente CD3 en células efectoras) con una afinidad de unión de al menos  $1 \times 10^{-6}$  M, como se describe con más detalle a continuación. En una realización preferida, la afinidad de unión a CD3 es  $1 \times 10^{-6}$  M -  $1 \times 10^{-10}$  M, preferiblemente  $1 \times 10^{-7}$  M -  $1 \times 10^{-9}$  M.

Un anticuerpo biespecífico según la presente invención que se une a CD3 y un antígeno tumoral se une al antígeno tumoral, preferiblemente con una afinidad de unión que es mayor que la afinidad con la que se une a CD3. En una realización preferida, la afinidad de unión del antígeno tumoral en células tumorales es al menos 2 veces, más

preferiblemente 4 veces, más preferiblemente 6 veces, o 10 veces mayor que la afinidad de unión a CD3. En una realización preferida, la afinidad de unión a antígeno tumoral es  $1 \times 10^{-6}$  M -  $1 \times 10^{-10}$  M, preferiblemente  $1 \times 10^{-7}$  M -  $1 \times 10^{-10}$  M, más preferiblemente al menos  $1 \times 10^{-8}$ , preferiblemente al menos  $1 \times 10^{-9}$ . Preferiblemente en combinación con una afinidad de CD3 que es al menos 2 veces, más preferiblemente 4 veces, más preferiblemente 6 veces, o 10 veces menor que la afinidad indicada de unión al antígeno tumoral. En una realización preferida, la afinidad de unión al antígeno tumoral es  $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-10}$ .

El término "células aberrantes" como se usa en este documento incluye células Tumorales, más específicamente células Tumorales de origen hematológico que incluyen también células preleucémicas, tales como células que causan síndromes mielodisplásicos (MDS) y células leucémicas tales como células Tumorales de leucemia mieloide aguda (AML) o Leucemia mielógena crónica (LMC).

El término "célula efectora inmune" o "célula efectora" como se usa en el presente documento se refiere a una célula dentro del repertorio natural de células en el sistema inmune de los mamíferos que puede activarse para afectar la viabilidad de una célula diana. Las células efectoras inmunes incluyen células del linaje linfoide, como las células asesinas naturales (NK), linfocitos T que incluyen linfocitos T citotóxicos o células B, pero también las células del linaje mieloide pueden considerarse células efectoras inmunes, como los monocitos o macrófagos, Células dendríticas y granulocitos neutrófilos. Por lo tanto, dicha célula efectora es preferiblemente una célula NK, una célula T, una célula B, un monocito, un macrófago, una célula dendrítica o un granulocito neutrófilo. De acuerdo con la invención, el reclutamiento de células efectoras en células aberrantes significa que las células efectoras inmunes se acercan a las células diana aberrantes de manera que las células efectoras pueden matar directamente, o indirectamente iniciar la destrucción de las células aberrantes que se reclutan para lo que son reclutadas ellas. Se prefiere que un anticuerpo de unión a CD3 se una a CD3 en la superficie de las células efectoras.

Un anticuerpo que se une a CD3 humano de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI  
 WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
 YNWFDPWGQG TLVTV SS

Con 0-5 sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>; diferente de las regiones CDR.

en donde

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A.

La región variable de la cadena pesada puede tener 0-5 sustituciones de aminoácido, con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada, están, por supuesto, solamente en posiciones distintas a las posiciones indicadas por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>. En las posiciones indicadas por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> solo se permiten los aminoácidos indicados. En una realización preferida, la región variable de la cadena pesada comprende 0-4, preferiblemente 0-3, preferiblemente 0-2, preferiblemente 0-1 y preferiblemente 0 sustituciones de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos indicadas en posiciones diferentes de las posiciones indicadas por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>. Y diferentes de las regiones CDR. Una combinación de una inserción, adición, supresión o sustitución es una combinación si las secuencias alineadas no difieren en más de 10, preferiblemente no más de 5 posiciones. Un espacio en una de las secuencias alineadas cuenta para la cantidad de aminoácidos omitidos en la otra secuencia.

Las inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones o combinaciones de aminoácidos no están preferiblemente en la región CDR3 de la región variable de la cadena pesada, preferiblemente no en la región CDR1 y/o CDR2 de la región variable de la cadena pesada. En una realización preferida, la región variable de la cadena pesada no comprende una supresión, adición o inserción respecto a la secuencia indicada. En esta realización, la región variable de la cadena pesada puede tener 0-5 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácido indicada. Una sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservadora.

Un anticuerpo que se une a CD3 humano de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI  
 WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
 YNWFD PWGQG TLVTV SS

5 con 0-5 sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> y distintas de las regiones CDR;

en donde

10 X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

15 X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

20 X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A, es preferiblemente un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos identificada por los números 5192; 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se representa en las figuras 12, 25 y 28. La región variable de la cadena pesada comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos identificada por los números 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se representa en las figuras 12 y 25. La región variable de cadena pesada del anticuerpo comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos identificada por el número 5196 como se representa en las  
 25 figuras 12.

**[0066]**

30 La invención proporciona además un anticuerpo biespecífico que se une a CD3 humano de la invención que comprende una cadena pesada y una cadena ligera en la que la región de cadena pesada de dicha cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI  
 WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
 YNWFD PWGQG TLVTV SS

35 con 0-5 sustituciones de aminoácido en una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> y distintas de las regiones CDR;

en donde

40 X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

45 X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A.

50 La cadena ligera es una cadena ligera común como se define en otra parte de este documento. El anticuerpo biespecífico comprende además una combinación de cadena pesada y cadena ligera que se une a otro antígeno, preferiblemente un antígeno tumoral. La cadena ligera de la combinación de cadena pesada y cadena ligera que se une a otro antígeno es preferiblemente una cadena ligera común como se define en otra parte en este documento. La cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido:

55

## ES 2 693 596 T3

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGL E WVAAI  
WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
YNWFD PWGQG TLVTV SS

con 0-5 sustituciones de aminoácido en una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> y distintas de las regiones CDR;

5

en donde

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

10

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

15

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

20

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A, es preferiblemente una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido identificada por los números 5192; 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se representa en las figuras 12, 25 y 28. La región variable de cadena pesada del anticuerpo biespecífico comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos identificada por los números 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se representa en las figuras 12 y 25. La región variable de cadena pesada del anticuerpo biespecífico comprende preferiblemente una secuencia de aminoácido identificada por el número 5196 como se representa en las figuras 12.

25

[0067]

25

Un anticuerpo biespecífico de la invención que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGL E WVAAI  
WYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG  
YNWFD PWGQG TLVTV SS

30

con 0-5 sustituciones de aminoácido en una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> y distintas de las regiones CDR;

en donde

35

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

40

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

45

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A.

preferiblemente comprende además una combinación de cadena pesada/ligera que se une a CLEC12A humana. En una realización preferida la cadena pesada de la combinación de cadena pesada/ligera que se une a CLEC12A humana comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos:

QVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT SYMH WVRQA PGQGL EWMGI  
INPSG GSTSY AQKFQ GRVTM TRDTS TSTVY MELSS LRSED TAVYY CAKGT  
TGDWF DYWGQ GTLVT VSS;

50

EVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT SYMH WVRQA PGQGL EWMGI  
 INPSG GSTSY AOKFQ GRVTM TRDTS TSTVY MELSS LRSED TAVYY CARGN  
 YGDEF DYWGQ GTLVT VSS; o

QVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT GYMH WVRQA PGQGL EWMGW  
 INPNS GGTNY AOKFQ GRVTM TRDTS ISTAY MELSR LRSDD TAVYY CARDG  
 YFADA FDYWG QGTLV TVSS;

5 con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones de aminoácido, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de los mismos.

10 La región variable de la cadena pesada de la combinación de cadena pesada/ligera que se une a CLEC12A humana puede tener 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones de aminoácido, supresiones, sustituciones, adiciones con respecto a la secuencia de aminoácido indicada, o una combinación de las mismas. En una realización preferida, la región variable de la cadena pesada comprende 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, preferiblemente 0-3, preferiblemente 0-2, preferiblemente 0-1 y preferiblemente 0 inserciones de aminoácido, supresiones, sustituciones, adiciones con respecto a la secuencia de aminoácido indicada, o una combinación de las mismas. Una combinación de una inserción, supresión, adición o sustitución es una combinación según se reivindica si las secuencias alineadas no difieren en más de 5 posiciones. Un espacio en una de las secuencias alineadas cuenta para la cantidad de aminoácidos omitidos en la otra secuencia.

15 Una inserción, supresión, sustitución, adición o combinación de los mismos en una región variable de la cadena pesada de CD3 como se describe en este documento, preferiblemente deja H35, A61, Y102, N103 y W104 y las posiciones en el CDR3 VH sin cambios. Si se modifica A50, preferiblemente se sustituye por S, Y, M o Q. Si se modifica D59, se sustituye preferiblemente por una Y o una E, sin embargo, la sustitución de D59 por L, I, V, F, R, A, N, H, S, T también es posible. Si A61 está sustituido, se sustituye preferiblemente por N, I, H, Q, L, R, Y, E, S, T, D, K, V. Si se modifica F105, preferiblemente se sustituye por una Y o una M para el CD3 VH de la invención, se cree que los residuos de H35, Y102, N103 y W104 son relevantes para la unión a CD3. Otras sustituciones específicas en las posiciones A50, D59, A61 y F105 también son relevantes, pero no tienen que afectar la unión a CD3. La Tabla 2 enumera la sustitución de aminoácido introducida en la columna 2. Aquellos que también se recuperaron se mencionan en la columna 3. Se cree que las sustituciones de aminoácidos que se introdujeron pero no se recuperaron afectan al anticuerpo y no se desean. Por ejemplo, no se desea una mutación A50I. Las sustituciones de aminoácido toleradas se pueden encontrar fácilmente utilizando el método descrito en el ejemplo 5A junto con CIEX-HPLC después del almacenamiento.

20 Una inserción, supresión, sustitución, adición o combinación de aminoácidos de los aminoácidos no se realiza preferiblemente en la interfase de unión de la cadena pesada y ligera.

25 Si un aminoácido se cambia en la interfase de la interacción de la cadena H/L, se prefiere que los correspondientes aminoácidos en la otra cadena se cambien para adaptarse al cambio. Una inserción o adición de un aminoácido preferiblemente no implica la inserción o adición de una prolina.

30 En principio, una adición de un aminoácido puede considerarse como una inserción. Agregar un aminoácido a uno de los extremos de una cadena polipeptídica a veces no se considera una inserción sino como una adición (prolongación) estricta. Para la presente invención, tanto una adición dentro de una cadena como a uno de los extremos, se consideran una inserción.

35 Las inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones o combinaciones de aminoácidos no están preferiblemente en la región CDR3 de la región variable de la cadena pesada, preferiblemente no en la región CDR1 o CDR2 de la región variable de la cadena pesada. En una realización preferida, la región variable de la cadena pesada no comprende una supresión, adición o inserción con respecto a la secuencia indicada. En esta realización, la región variable de la cadena pesada puede tener 0-5 sustituciones de aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácido indicada. Una sustitución de aminoácidos es preferiblemente una sustitución de aminoácidos conservadora. La CDR1, CDR2 y CDR3 de un VH de unión a CD3 de la invención comprenden preferiblemente respectivamente la secuencia de aminoácidos GFTFSSYG para CDR1 (según IMGT), IWYNARKQ para CDR2 y GTGYNWFDP para CDR3. La CDR1, CDR2 y CDR3 de un VH de unión a CLEC12A de la invención preferiblemente comprende respectivamente la secuencia de aminoácido GYTFTSY para CDR1, INPSGGST para CDR2 y GTTGDWFDY para CDR3.

40 La región variable de la cadena ligera comprende preferiblemente un segmento en V de la región variable de la línea germinal 012. En una realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la cadena ligera kappa IgVκ1-39\*01 del segmento V. En una realización particularmente preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la cadena ligera kappa IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 o IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*05. En una realización más preferida, la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 de cadena ligera kappa de línea germinal.

En un anticuerpo biespecífico de la invención, se prefiere que la cadena ligera sea la misma para ambas combinaciones de cadena pesada/cadena ligera. Dicha cadena ligera también se denomina "cadena ligera común". El término "cadena ligera común" de acuerdo con la invención se refiere a cadenas ligeras que pueden ser idénticas o tener algunas diferencias de secuencia de aminoácidos, mientras que retienen la especificidad de unión del anticuerpo. Es posible, por ejemplo, dentro del alcance de la definición de cadenas ligeras comunes como se usa en este documento, preparar o encontrar cadenas ligeras que no son idénticas, pero aún funcionalmente equivalentes, por ejemplo, introduciendo y probando cambios de aminoácidos conservadores, cambios de aminoácidos en regiones que no lo hacen o solo contribuyen parcialmente a la especificidad de unión cuando se empareja con la cadena pesada, y similares. Los términos "cadena ligera común", "VL común", "cadena ligera única", "VL única", con o sin la adición del término "reorganizado" se usan aquí de manera intercambiable. Un aspecto de la presente invención es utilizar como cadena ligera común una cadena ligera humana que puede combinarse con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios de unión a antígeno funcionales (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al. 1998, Nissim et al. 1994). Preferiblemente, la cadena ligera común tiene una secuencia de línea germinal. Una secuencia de línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se usa frecuentemente en el repertorio humano y tiene una capacidad superior para emparejarse con muchas regiones VH diferentes, y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad.

En una realización preferida, la cadena ligera común comprende una región variable de cadena ligera que comprende una línea germinal O12/IgVκ1-39\*01. En una realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la cadena ligera kappa IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 o IgVκ1-39\*01/IGJκ5\*01. En una realización preferida, un IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01. La región variable de la cadena ligera comprende preferiblemente una cadena ligera kappa de línea germinal IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 o una cadena ligera kappa de línea germinal IgVκ1-39\*01/IGJκ5\*01. En una realización preferida, una línea germinal IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01. Obviamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena ligera de los cuales la secuencia de aminoácido no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena ligera en la que están presentes mutaciones (supresiones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales.

En una forma de realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASLQ SGVPS RFGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASLQ SGVPS RFGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK con 0-5 sustituciones de aminoácidos.

En una realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende 0-4, preferiblemente 0-3, preferiblemente 0-2, preferiblemente 0-1 y preferiblemente 0 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácido indicada. Una combinación de una inserción, supresión, adición o sustitución es una combinación según se reivindica si las secuencias alineadas no difieren en más de 5 posiciones. Un espacio en una de las secuencias alineadas cuenta para la cantidad de aminoácidos omitidos en la otra secuencia. En una forma de realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASLQ SGVPS RFGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASLQ SGVPS RFGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK. En una realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácido DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASLQ SGVPS RFGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK. En otra realización preferida, la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácido DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASLQ SGVPS RFGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK.

Las inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o combinaciones de los mismos no están preferiblemente en la región CDR3 de la región variable de la cadena ligera, preferiblemente no en la región CDR1 o CDR2 de la región variable de la cadena pesada. En una realización preferida, la región variable de la cadena pesada no comprende una supresión, adición o inserción con respecto a la secuencia indicada. En esta realización, la región variable de la cadena pesada puede tener 0-5 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada. Una sustitución de aminoácido es preferiblemente una sustitución de aminoácido conservador. La CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera de un anticuerpo de la invención comprenden preferiblemente respectivamente, la secuencia de aminoácidos CDR1 - QSISSY, CDR2 - AAS, CDR3 - QSYSTP, es decir, los CDR de IGKV1-39 (según IMGT).

Como se mencionó anteriormente en este documento, se prefiere que el anticuerpo de la invención sea un anticuerpo biespecífico. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico comprende una combinación de cadena pesada/ligera de unión a CD3 como se indica en el presente documento, y una combinación de cadena pesada/ligera que se une a un antígeno tumoral. En una realización preferida, la combinación de cadena pesada/ligera de unión a antígeno tumoral se une a CLEC12A.

La región constante de un anticuerpo (biespecífico) de la presente invención es preferiblemente una región constante humana. La región constante puede contener una o más, preferiblemente no más de 10, preferiblemente no más de 5 diferencias de aminoácidos con la región constante de un anticuerpo humano de ocurrencia natural. Diversos dominios

variables de anticuerpos producidos en este documento se derivan de una biblioteca de dominios variables de anticuerpos humanos. Como tales, estos dominios variables son humanos. Las regiones CDR únicas pueden ser derivadas de humanos, ser sintéticas o derivadas de otro organismo. Un anticuerpo o anticuerpo biespecífico de la invención es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado.

En la técnica existen diversos métodos para producir anticuerpos. Los anticuerpos son producidos típicamente por una célula que expresa el ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Las células adecuadas para la producción de anticuerpos son una célula de hibridoma, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula NS0 o una célula PER-C6. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula CHO.

Varias instituciones y compañías han desarrollado líneas celulares para la producción a gran escala de anticuerpos, por ejemplo, para uso clínico. Ejemplos no limitantes de tales líneas celulares son células CHO, células NS0 o células PER.C6. Estas células también se utilizan para otros fines, como la producción de proteínas. Las líneas celulares desarrolladas para la producción a escala industrial de proteínas y anticuerpos se denominan en el presente documento líneas celulares industriales. También se describe una línea celular industrial que produce y un anticuerpo de la invención.

También se describe una célula que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o un ácido nucleico como se describe en el presente documento. Dicha célula es preferiblemente una célula animal, más preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula de primate, más preferiblemente una célula humana. Para los fines en este documento, una célula adecuada es cualquier célula capaz de comprender y preferiblemente producir un anticuerpo de acuerdo con la invención y/o un ácido nucleico como se describe.

También se describe una célula que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención. Preferiblemente dicha célula (típicamente una célula in vitro, aislada o recombinante) produce dicho anticuerpo. En una realización preferida, dicha célula es una célula de hibridoma, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula NS0 o una célula PER.C6. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula CHO. Además, se proporciona un cultivo celular que comprende una célula de acuerdo con lo descrito. Diversas instituciones y compañías han desarrollado líneas celulares para la producción a gran escala de anticuerpos, por ejemplo, para uso clínico. Ejemplos no limitantes de tales líneas celulares son células CHO, células NS0 o células PER.C6. Estas células también se utilizan para otros fines, como la producción de proteínas. Las líneas celulares desarrolladas para la producción a escala industrial de proteínas y anticuerpos se denominan en el presente documento líneas celulares industriales. Por lo tanto, también se describe el uso de una línea celular desarrollada para la producción a gran escala de anticuerpos para la producción de un anticuerpo de la invención. También se describe una célula para producir un anticuerpo que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un VH, un VL y/o una cadena pesada y ligera de un anticuerpo como se reivindica. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico codifica un VH identificado por el número 5196 de la figura 12, una molécula de ácido nucleico que codifica un VH como se identifica por el número 4327 de la figura 24 o una combinación de los mismos.

También se describe un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula como se describe en el presente documento y recoger dicho anticuerpo de dicho cultivo. Preferiblemente, dicha célula se cultiva en un medio sin suero. Preferiblemente dicha célula está adaptada para el crecimiento en suspensión. Se describe adicionalmente un anticuerpo que puede obtenerse mediante un método para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. El anticuerpo se purifica preferiblemente del medio del cultivo. Preferiblemente dicho anticuerpo es purificado por afinidad.

Una célula como se describe es, por ejemplo, una línea celular de hibridoma, una célula CHO, una célula 293F, una célula NS0 u otro tipo de célula conocida por su idoneidad para la producción de anticuerpos con fines clínicos. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula humana. Preferiblemente, una célula que se transforma por una región E1 de adenovirus o un equivalente funcional de la misma. Un ejemplo preferido de dicha línea celular es la línea celular PER.C6 o su equivalente. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula CHO o una variante de la misma. Preferiblemente, una variante que hace uso de un sistema de vector de Glutamina sintetasa (GS) para la expresión de un anticuerpo.

También se describe un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula como se describe y recolectar dicho anticuerpo de dicho cultivo. Preferiblemente, dicha célula se cultiva en un medio sin suero. Preferiblemente dicha célula está adaptada para el crecimiento en suspensión. Se describe adicionalmente un anticuerpo que puede obtenerse mediante un método para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. El anticuerpo se purifica preferiblemente del medio del cultivo. Preferiblemente dicho anticuerpo es purificado por afinidad.

Los anticuerpos biespecíficos también suelen producirse por células que expresan ácido nucleico que codifica el anticuerpo. En este caso, la célula expresa las diferentes cadenas ligeras y pesadas que forman el anticuerpo biespecífico. Para ello, las células expresan dos cadenas pesadas diferentes y al menos una cadena ligera. Como las cadenas pesadas no modificadas pueden emparejarse entre sí para formar dímeros, tales células producen típicamente los dos anticuerpos monoclonales (homodímeros), además del anticuerpo biespecífico (heterodímero). El número de posibles combinaciones de cadena pesada/ligera en los anticuerpos producidos aumenta cuando la célula expresa dos o más cadenas ligeras. Para reducir el número de diferentes especies de anticuerpos (combinaciones de diferentes cadenas pesadas y ligeras) producidas, se prefiere la mencionada "cadena ligera común".

Una célula productora de anticuerpos que expresa una cadena ligera común y cantidades iguales de las dos cadenas pesadas produce típicamente un 50% de anticuerpos biespecíficos y un 25% de cada uno de los anticuerpos mono-específicos (es decir, que tienen combinaciones idénticas de cadenas pesada/ligera). Se han publicado varios métodos para favorecer la producción del anticuerpo biespecífico o viceversa, los anticuerpos mono-específicos. En la presente invención, se prefiere que la célula favorezca la producción del anticuerpo biespecífico sobre la producción de los respectivos anticuerpos mono-específicos. Esto se logra típicamente modificando la región constante de las cadenas pesadas de manera que favorezcan la heterodimerización (es decir, la dimerización con la cadena pesada de la otra combinación de cadena pesada/ligera) sobre la homodimerización. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina diferentes con dominios de heterodimerización compatibles. Se han descrito diversos dominios de heterodimerización compatibles en la técnica (ver, por ejemplo, Gunasekaran et al. JBC 2010 (285) 19637-19646). Los dominios de heterodimerización compatibles son preferiblemente dominios de heterodimerización CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina compatible. La técnica describe diversas formas en las que se puede lograr dicha heterodimerización de cadenas pesadas. Una manera es generar anticuerpos biespecíficos "perilla en el hueco". Ver la solicitud de patente estadounidense 20030078385 (Arathoon et al. - Genentech).

En los documentos US 9,248,181, US 9,358,286 y PCT/NL2013/050294 (publicados como WO2013/157954) se describen métodos y medios para producir anticuerpos biespecíficos utilizando dominios de heterodimerización compatibles. Estos medios y métodos también se pueden emplear favorablemente en la presente invención. Específicamente, las mutaciones preferidas para producir esencialmente solo moléculas de IgG de longitud completan biespecíficas son las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración según Kabat) en el primer dominio CH3 (la cadena pesada de la "variante KK") y las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E en el segundo dominio (la cadena pesada "variante DE"), o viceversa. Se demostró previamente en nuestro documento US 9,248,181 y las patentes US 9,358,286, así como la solicitud PCT WO2013/157954 que la variante DE y la variante KK preferencialmente se emparejan para formar heterodímeros (las llamadas moléculas biespecíficas "DEKK"). La homodimerización de las cadenas pesadas de la variante DE (homodímeros DEDE) o las cadenas pesadas de la variante KK (homodímeros KKKK) casi no se produce debido a la fuerte repulsión entre los residuos cargados en la interfaz CH3-CH3 entre cadenas pesadas idénticas. En una realización, la combinación de cadena pesada/cadena ligera que comprende el dominio variable que se une a CD3, comprende una variante KK de la cadena pesada. En esta realización, la combinación de cadena pesada/cadena ligera que comprende el dominio variable que se une a otro antígeno diferente de CD3 comprende una variante DE de la cadena pesada. En una realización preferida, el antígeno distinto de CD3 es CLEC12A. En una realización preferida, el VH del dominio variable que se une a CLEC12A es MF4327\_VH como se muestra en la figura 24.

Algunos anticuerpos se modifican en la región bisagra CH2/inferior, por ejemplo, para reducir la interacción del receptor Fc o para reducir la unión de C1q. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo IgG con un CH2 mutante y/o un dominio bisagra inferior de tal manera que se reduce la interacción del anticuerpo IgG biespecífico con un receptor Fc-gamma. Un tal CH2 mutante y/o el dominio bisagra inferior comprenden preferiblemente una sustitución amino en la posición 235 y/o 236 (numeración Kabat), preferiblemente una sustitución L235G y/o G236R.

La invención describe además un método para tratar el cáncer o un riesgo de cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita un anticuerpo biespecífico que se une a CD3 humano, cuyo anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera en donde dicha cadena pesada comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácido:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA  
 IWYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub> RKQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT  
 GYNWF DPWGQ GTLVT VSS

con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de las mismas en una o más posiciones distintas a la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>;

en donde

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

X<sub>1</sub> = S y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A; y

una combinación de cadena pesada - cadena ligera (H/L) que se une a un tumor-antígeno.

5 La cadena ligera comprende preferiblemente una región variable de cadena ligera común. Dicha región variable de cadena ligera común comprende preferiblemente una región variable de cadena ligera O12/IgVκ1-39. Dicha región variable de la cadena ligera es preferiblemente una región variable de la línea germinal O12/IgVκ1-39\*01. Dicha región variable de la cadena ligera comprende preferiblemente la cadena ligera kappa IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 o IgVκ1-39\*01/IGJκ5\*01. La región variable de la cadena ligera comprende preferiblemente la cadena ligera kappa de la línea germinal IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 o IgVκ1-39\*01/IGJκ5\*01. Dicha región variable de cadena ligera comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos. DIQMT QSPSS LSASV GDRV T ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS  
10 GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRV T ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK con 0-5 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de los mismos. Preferiblemente, la combinación de cadena pesada/cadena ligera (H/L) que se une a un antígeno tumoral se une a  
15 CLEC12A.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina diferentes con dominios de heterodimerización compatibles. Dichos dominios de heterodimerización compatibles son preferiblemente dominios de heterodimerización CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina compatibles. Dicho anticuerpo biespecífico es preferiblemente un anticuerpo IgG con un CH2 mutante y/o un dominio de bisagra inferior de manera que se reduce la interacción del anticuerpo IgG biespecífico con un receptor Fc-gamma. El dominio bisagra CH2 y/o inferior mutante comprenden preferiblemente una sustitución amino en la posición 235 y/o 236 (numeración Kabat), preferiblemente una sustitución L235G y/o G236R. El anticuerpo comprende preferiblemente una cadena ligera común.

25 También se proporciona un anticuerpo biespecífico que se une a CD3 humano cuyo anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera en donde dicha cadena pesada comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA

IWYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>RKQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT

30 GYNWF DPWGQ GTLVT VSS

con 0-5 sustituciones de aminoácido en una o más posiciones diferentes de la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> y distinta de las regiones CDR,

35 en donde

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

40 X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

45 X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A; y dicha cadena ligera comprende la región variable de cadena ligera O12/IgVκ1-39 de la figura 23a con 0-5 sustituciones de aminoácido y una cadena pesada y una cadena ligera que se unen a un antígeno tumoral.

Se describe adicionalmente un anticuerpo de la invención o un derivado del mismo o una composición farmacéutica de la invención, para uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite. Para el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un tumor, se prefiere que el anticuerpo sea un anticuerpo biespecífico de la invención. Preferiblemente, en el que el anticuerpo de unión a CD3 comprende una combinación de cadena pesada/ligera que se une a un antígeno tumoral. El anticuerpo biespecífico es preferiblemente un anticuerpo de unión a CD3/CLEC12A.

55 Se describen los anticuerpos biespecíficos CD3/antígeno tumoral y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos biespecíficos para uso en el tratamiento de tumores sólidos o hematológicos. Los tumores sólidos preferidos son de origen epitelial; cáncer ginecológico como los tumores de ovario y endometrio; cáncer de próstata, cáncer cerebral o cualquier otro tumor sólido.

60 También se describe un anticuerpo biespecífico CD3/antígeno tumoral de la invención o un derivado del mismo o composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo biespecífico o derivado del mismo para uso en el tratamiento de diversas leucemias y enfermedades preleucémicas de origen mielóide pero también linfomas de células B. Las enfermedades que pueden tratarse incluyen leucemias mieloides o enfermedades preleucémicas como la leucemia

mieloide aguda (AML), el síndrome mielodisplásico (MDS) y la leucemia mielógena crónica (CML) y los linfomas de Hodgkin y la mayoría de los linfomas no Hodgkin. También B-LL; T-ALL, linfoma de células del manto también son objetivos preferidos para el tratamiento con el anticuerpo de la invención. De este modo, también se describe un anticuerpo IgG de longitud completa biespecífico de acuerdo con la invención para su uso como un producto farmacéutico en el tratamiento del síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mielógena crónica (CML), mieloma múltiple (MM) o preferiblemente leucemia mieloide aguda (AML). También se describe el uso de un anticuerpo IgG biespecífico según la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de MDS, CML, MM o preferiblemente AML. Se prefiere que el antígeno tumoral sea CLEC12A.

La cantidad de anticuerpo según la invención que se administrará a un paciente está típicamente en la ventana terapéutica, lo que significa que se usa una cantidad suficiente para obtener un efecto terapéutico, mientras que la cantidad no excede un valor de umbral que conduce a una extensión inaceptable de efectos secundarios. Cuanto menor sea la cantidad de anticuerpo necesario para obtener un efecto terapéutico deseado, mayor será la ventana terapéutica. Por lo tanto, se prefiere un anticuerpo de acuerdo con la invención que ejerza efectos terapéuticos suficientes a dosis bajas.

Aproximadamente 30,000 pacientes son diagnosticados cada año con AML en Europa y EE. UU. La mayoría de estos pacientes tienen 60 años de edad o más. La edad avanzada es un determinante negativo importante del resultado en la AML y a largo plazo la supervivencia (a los 5 años) de los pacientes mayores de AML tratados intensivamente es aproximadamente del 10%. En casi todos los pacientes que han alcanzado la remisión con la quimioterapia de inducción, la progresión de la enfermedad se observa dentro de los 3 años. El tratamiento actual posterior a la remisión ha demostrado un valor limitado, si lo hubiera, en pacientes de edad avanzada con AML. Por lo tanto, permanece una carga significativa de leucemia resistente residual, y la subpoblación superviviente de células leucémicas resistentes a los medicamentos genera la recurrencia rápidamente. Se necesitan nuevos tipos de medicamentos con modos de acción completamente diferentes para tratar estas células tumorales AML no sensible a la quimioterapia en esfuerzos para inducir y mantener remisiones completas. Si bien se puede lograr una remisión completa (CR) con varias combinaciones de quimioterapia intensiva en más del 50% de los pacientes ancianos con AML y alrededor del 80% en pacientes más jóvenes, los avances en la respuesta o la supervivencia siguen siendo un desafío importante para la investigación. En un metanálisis de red recientemente publicado de 65 ensayos clínicos aleatorios (15.110 pacientes) en pacientes de edad avanzada con AML, la mayoría de los regímenes de inducción investigativa modificados tienen perfiles de eficacia similares o incluso peores en comparación con el régimen de inducción convencional 3 + 7 con daunorubicina y citarabina. Este tratamiento estándar de la AML se asocia con una alta morbilidad e incluso mortalidad. La mayoría de los pacientes en CR recaen debido a células madre leucémicas restantes después de la quimioterapia. La intensificación adicional de la dosis es limitada debido a una toxicidad inaceptable. Por lo tanto, está surgiendo una necesidad urgente de nuevas modalidades de tratamiento, preferiblemente con menos toxicidad, especialmente en pacientes ancianos con AML.

El tratamiento de la quimioterapia sin respuesta AML podría lograrse redirigiendo los linfocitos T del propio sistema inmunitario del paciente a las células tumorales de AML y la posterior activación específica de los linfocitos T por tumores utilizando un anticuerpo biespecífico. Este proceso también se conoce como el llamado "enfoque de interacción con células T". De esta manera, el sistema inmunológico de los pacientes se fortalece y se redirige para atacar y erradicar las células tumorales de AML. La presente invención proporciona anticuerpos contra IgG biespecíficos CD3xCLEC12A que redireccionan eficazmente los linfocitos T hacia las células tumorales de AML, induciendo así la lisis de las células tumorales de AML. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCLEC12A son, por lo tanto, una terapia dirigida con menos efectos secundarios, que erradica específicamente blastos de AML y células madre leucémicas para mejorar el pronóstico de los pacientes con AML. Debido a que CLEC12A se expresa en células madre leucémicas (LSC) y no en células madre hematopoyéticas normales, se anticipa que la terapia dirigida contra este antígeno se anticipa que erradica la LSC mientras se preserva la célula madre normal. Estos anticuerpos biespecíficos de IgG de longitud completa se evalúan clínicamente en pacientes con AML en recaída y/o refractarios. La eficacia clínica se analiza mediante la reducción de blastos de AML en la médula ósea como criterio de respuesta objetiva. Una IgG biespecífica eficaz para la AML proporciona una nueva opción de agente terapéutico para un segmento de paciente grande para el cual actualmente no hay tratamiento disponible. Además de proporcionar un medio para lograr remisiones duraderas esta opción de tratamiento también tiene un potencial curativo para la AML cuando se aplica durante la remisión. Lo más probable es que tenga el mayor impacto en situaciones de enfermedad residual mínima (MRD). La expectativa es que el porcentaje de recaída se reducirá debido a la erradicación de la MRD. Por lo tanto, el impacto para el paciente con AML de esta nueva modalidad de tratamiento sería un tratamiento menos tóxico con un menor porcentaje de recaídas, lo que resultaría en una mejora del resultado asociado con una mejor calidad de vida.

Los anticuerpos 15C3 y 3056 descritos en la técnica comparten la misma región variable de cadena pesada, pero difieren en la región variable de cadena ligera. La variación de lote a lote en el potencial de unión del anticuerpo se observó en los lotes del anticuerpo 3056. Esto no se observó para el anticuerpo 15C3. Como los anticuerpos difieren en la cadena ligera, la razón de la diferencia en el comportamiento sería la diferente cadena ligera. El SDS-page reveló que el anticuerpo 3056 estaba intacto también en lotes con un anticuerpo menos activo. El modelado en 3D de los dominios variables de los anticuerpos reveló algunos cambios en el plegamiento del dominio VH/VL entre los dos anticuerpos. Como estos cambios podrían explicar el comportamiento diferente de los anticuerpos, los experimentos se diseñaron para hacer que el plegamiento del dominio VH/VL del anticuerpo 3056 sea más parecido al 15C3. Desafortunadamente, esto no explicó las diferencias entre los anticuerpos 15C3 y 3056. El enfoque isoeléctrico (IEF) solo reveló ligeras diferencias entre 15C3

(3055) y 3056 vinculados a la banda principal en un punto alto isoeléctrico del anticuerpo. El análisis posterior con CLEX-HPLC, una técnica cromatográfica que permite la separación de variantes de carga, revelado, dependiendo del lote, un espectro de retención muy complejo con un amplio perfil de elución para el anticuerpo, esto en contraste con el perfil observado para 15C3 (3055). Además, se encontró que el patrón 3056 cambió significativamente a lo largo del tiempo, lo que sugiere que el anticuerpo 3056 es inherentemente inestable.

5

Solo cuando se diseñaron variantes en las que la cadena 3056\_VH se cambió en una o dos posiciones específicas, el comportamiento cambió. El comportamiento varió entre la actividad inestable, sin actividad de unión a la unión sin una variabilidad significativa de lote a lote.

10

La cadena pesada 3056 contiene un motivo de desamidación NG en su región CDR2, WYNGR<sup>K</sup>Q, que podrían estar involucrados en la heterogeneidad de carga observada del anticuerpo 3056. El modelado in silico de los Fab 15C3 y 3056 no reveló una diferencia significativa en el plegamiento del motivo de desamidación de NG en la región HCDR2. Esto argumentó contra una participación de este motivo en la inestabilidad observada del anticuerpo 3056. Sin embargo, sorprendentemente, los cambios indicados en las reivindicaciones redujeron significativamente la variación observada de lote a lote de los anticuerpos de la invención.

15

La invención proporciona además un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a CD3 y un dominio variable que se une a CLEC12A, en donde el dominio variable que se une a CLEC12A tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos identificada por los números 4327 de la figura 24 con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de ellas, y el dominio variable que se une a CD3 tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos identificada por los números 5192, 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se muestra en las figuras 12, 25 y 28 con 0-5 sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones distintas a las posiciones 54 y 55 y distintas de las regiones CDR. La cadena ligera comprende preferiblemente un dominio variable con aminoácido como se representa en la figura 23, preferiblemente 23B.

20

25

La invención proporciona además un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a CD3 y un dominio variable que se une a CLEC12A, en donde el dominio variable que se une a CLEC12A tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos identificada por los números 4327 de la figura 24 con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de las mismas, y el dominio variable que se une a CD3 tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos identificada por el número 5196 como se muestra en la figura 12 con 0-5 sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones distintas a las posiciones 54 y 55 y distintas de las regiones CDR.

30

35

La cadena pesada del dominio variable que se une a CD3 tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos identificada por los números 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se muestra en las figuras 12 y 25 con 0-5 amino sustituciones ácidas en una o más posiciones distintas de las posiciones 54 y 55 y distintas de las regiones CDR. El dominio variable que se une a CD3 tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos identificada por el número 5196 como se representa en las figuras 12 con 0-5 sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones distintas de las posiciones 54 y 55 y distintas de las regiones CDR; En una realización preferida, la región variable de la cadena pesada comprende 0-4, preferiblemente 0-3, preferiblemente 0-2, preferiblemente 0-1 y preferiblemente 0 sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada. Para la cadena pesada CD3, las sustituciones de aminoácidos indicadas se encuentran en posiciones distintas de las posiciones 54 y 55 y distintas de las regiones CDR. Una combinación de una inserción, adición, supresión o sustitución es una combinación si las secuencias alineadas no difieren en más de 10, preferiblemente no más de 5 posiciones. Un espacio en una de las secuencias alineadas cuenta para la cantidad de aminoácidos omitidos en la otra secuencia.

40

45

La invención proporciona además un anticuerpo que comprende un dominio variable que se une a CD3 y un dominio variable que se une a CLEC12A, en donde el dominio variable que se une a CLEC12A tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos identificada por los números 4327 de la figura 24, y el dominio variable que se une a CD3 tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos identificada por los números 5192, 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se muestra en las figuras 12, 25 y 28. La cadena pesada del dominio variable que se une a CD3 tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos identificada por los números 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; o 5694 como se muestra en las figuras 12 y 25. El dominio variable que se une a CD3 tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos identificada por el número 5196 como se muestra en las figuras 12.

50

55

Breve descripción de los dibujos

60

Figura 1. IEF de PG3055 y PG3056

Figura 2. Análisis CEX-HPLC de PG3055 y PG3056.

- Figura 3. Variabilidad y estabilidad de lote a lote de PG3055 y PG3056 analizados mediante análisis CEX-HPLC. 3055 lotes a la izquierda a lo largo del tiempo, 3056 lotes a la derecha a lo largo del tiempo, con muestras superiores almacenadas a -80 °C, en muestras inferiores almacenadas a 2-8 °C durante >3 meses.
- 5 Figura 4. Análisis de citometría de flujo para la unión de PG3055 y PG3056 a CD3 en linfocitos T humanas purificadas tras la incubación en medio IMDM + FBS al 10% a 2-8 °C o 37 °C durante 7 días. PG3055 y PG3056: incubados en medio IM-DM + 10% FBS a 2-8 °C durante 7 días. PG3055 a 37 °C y PG3056 a 37 °C: PG3055 y PG3056 incubados en medio y IMDM + 10% FBS a 37 °C durante 7 días.
- 10 Figura 5. Izquierda: Modelo de homología de PG3056 Fab ampliado en dominios variables, VL en gris claro, VH en negro, bucles HCDR1-3 en gris claro. Se indican los residuos Asn54 y Gly55 que forman el motivo de desamidación en HCDR2. Derecha: Superposición de modelos de homología de Fabs PG3055 (gris claro) y PG3056 (gris oscuro).
- Figura 6. Alineación de VH MF3056 (de MF3056\_VH) frente a la secuencia de la línea germinal VH3-33
- 15 Figura 7. Alineación de VH MF3056 frente a VH MF3872, MF3873 y MF3905
- Figura 8. Análisis de citometría de flujo para la unión a CD3 en células HPB-ALL de las variantes PG3872, PG3873 y PG3905. PG3056 fue incluido como control de referencia
- 20 Figura 9. Alineación de VH de MF3056 versus VH de MF3874, MF3878, MF3883, MF3886 y MF3891
- Figura 10. El análisis de citometría de flujo para la unión a CD3 en células HPB-ALL de las variantes PG3874, PG3878, PG3883, PG3886 y PG3891, PG3056 se incluyó como control de referencia.
- 25 Figura 11. Análisis CEX-HPLC de PG3891.
- Figura 12 Alineación de VH de MF3056 versus VH de MF5192-5197 VH
- 30 Figura 13. Análisis de citometría de flujo para la unión a CD3 en células HPB-ALL de variantes PG5192-5197, PG3056 se incluyó como control de referencia
- Figura 14. Análisis IEF de PG5196p06
- 35 Figura 15. Cromatograma CEX-HPLC de PG5196.
- Figura 16. Unión de 5196x4327 DM-Fc bsAb a CD3 expresado en membrana (HPB-ALL) y CLEC12A (HL-60)
- 40 Figura 17. 5196x4327 DM-Fc bsAb retuvo la activación específica de CLEC12A de los linfocitos T CD4 y CD8 reflejados por la regulación positiva del marcador de activación temprana CD69. El bsAb y las IgG de control se probaron a 1000 ng/mL. Los datos de citometría de flujo de activación de linfocitos T se expresan como el porcentaje de células positivas para CD69 dentro de las poblaciones de linfocitos T CD4 + o CD8 + HD1 y HD2 reflejan dos experimentos diferentes utilizando linfocitos T obtenidos de diferentes donantes sanos
- 45 Figura 18. Lisis de células diana mediada por antígeno 5196x4327 inducida
- Figura 19. Sensorgramas que muestran tasas de activación y desactivación de CD3 $\delta$ -Fc (A) y de proteína CLEC12A (B) a 5196x4327 DM-Fc bsAb inmovilizadas. Los sensorgramas muestran la respuesta (cantidad de proteína unida al chip, en unidades artificiales) en función del tiempo (en segundos). Ambos paneles muestran los sensorgramas obtenidos utilizando un rango de concentración de antígeno (en color) y los ajustes de curva respectivos realizados con el software de evaluación BIAevaluation (en negro)
- 50 Figura 20. La muestra de paciente con AML primaria se sometió a un fenotipo para la expresión de CLEC12A y la fracción de linfocitos T y blastos de AML mediante análisis de citometría de flujo al inicio (día = 0) del cocultivo. Después de los 7 días del cocultivo con 5196x4327 DM-Fc bsAb o control de isotipo, la fracción y el número total de linfocitos T y blastos de AML se cuantificaron mediante análisis de citometría de flujo
- 55 Figura 21. Análisis DSC como se describe en el ejemplo 9.
- 60 Figura 22. Secuencia variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo 15C3 descrita en el documento WO2005/118635. La publicación de patente describe dos variantes del anticuerpo 15C3. Ambas variantes tienen el mismo dominio variable de cadena pesada, pero este dominio variable de cadena pesada se combina con dos dominios variables de cadena ligera diferentes. Cuando se hace referencia aquí al anticuerpo 15C3, se hace referencia a un anticuerpo que tiene el dominio variable de cadena pesada como se representa en esta figura en combinación con el dominio variable de cadena ligera L2 como se indica en esta figura. El producto Fab de la cadena ligera 15C3 VH más L2 se denomina aquí MF3055.
- 65

El anticuerpo PG3056 tiene el VH como se describe aquí en combinación con la región variable de la cadena ligera IGKV1-39 como se representa en esta figura. El producto Fab de la cadena ligera 15C3 VH más IGKV1-39 también se conoce como MF3056.

5 Figura 23. El anticuerpo de la invención tiene preferiblemente una cadena ligera común. A) La cadena ligera común comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos representada como secuencia IGKV1-39 en esta figura. B) En una realización preferida, la cadena ligera común comprende la secuencia de aminoácidos representada como IGKV1-39/jk1 o IGKV1-39/jk5. En una realización particularmente preferida, la cadena ligera común comprende la secuencia de aminoácidos de IGKV1-39/jk1 como se representa en esta figura.

10 Figura 24. Secuencia de aminoácidos de la región VH de un Fab de anticuerpo de unión anti-CLEC12A (MF4327) y la secuencia de aminoácidos de la región VH de un Fab de unión de toxoide antitetánico (TT) (MF1337). Junto con la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera común representada en la figura 23, estos VH forman dominios variables de los Fabs MF4327 y MF1337 que se unen a CLEC12A y toxoide tetánico, respectivamente.

15 Figura 25. Ejemplos de las variantes de unión a CD3 de MF5196 son MF5603, MF5616, MF5626, MF5630, MF5648, MF5661 y MF5694, todas ellas que contienen la región VL de IGKVI-39/IGKJI humana reorganizada. Se indica la secuencia de aminoácidos de la VH de los Fab.

20 Figura 26. Unión de anticuerpos que comprenden MF5196 VH; MF5603 VH; MF5616 VH; MF5626 VH; MF5630 VH; MF5648 VH; MF5661 VH y MF5694 VH y una cadena ligera común como se muestra en la figura 23B, a CD3 expresado en membrana en células HPB-ALL, según se analiza mediante citometría de flujo.

25 Figura 27. Cromatograma PG5661 CIEX-HPLC.

Figura 28 Los Fabs de unión a CD3 MF5351, MF5354 y MF5356, compuestos de la región VL de IGKVI-39/IGKJ1 humana reordenada tienen la VH respectiva como se representa.

30 Figura 29. Unión de formato PG a CD3 expresado en membrana en células HPB-ALL, todos estos ejemplos se unen a CD3.

## EJEMPLOS

35 Como se usa en este documento, "MFXXXX" en donde X es independientemente un número 0-9, se refiere a un Fab que comprende un dominio variable en donde VH tiene la secuencia de aminoácidos identificada por los 4 dígitos. A menos que se indique lo contrario la región variable de cadena ligera del dominio variable tiene típicamente una secuencia de la figura 23, típicamente 23B. "MFXXXX VH" se refiere a la secuencia de aminoácidos de la VH identificada por los 4 dígitos. El MF comprende además una región constante de una cadena ligera y una región constante de una cadena pesada que normalmente interactúa con una región constante de una cadena ligera. PG se refiere a un anticuerpo monoespecífico que comprende cadenas pesadas y ligeras idénticas. PB se refiere a un anticuerpo biespecífico con dos cadenas pesadas diferentes. La región variable de las cadenas pesadas difiere y típicamente también la región CH3, en donde una de las cadenas pesadas tiene una mutación KK de su dominio CH3 y la otra tiene la mutación DE complementaria de su dominio CH3 (consulte la referencia PCT/NL2013/050294 (publicada como WO2013/157954).

45 Ejemplo 1: heterogeneidad de carga de 3055 y 3056 mAbs

Se utilizó el enfoque isoeléctrico (IEF) para determinar el pI y la heterogeneidad de carga de PG3056, un anticuerpo monoclonal IgG1 de longitud completa que comprende el VH MF3056 emparejado con la cadena ligera común IGKV1-39/JK1 y PG3055, un anticuerpo monoclonal IgG1 de longitud completa que comprende el mismo VH emparejado con la cadena ligera 15C3 VL2 - IGKV1-13. Para este propósito, se ejecutó un Focusgel con rango de pI 6-11 (Webscientific, cat# 1006-03) en una unidad de electroforesis GE Healthcare Multiphor II equipada con una placa de enfriamiento que se enfrió a 10 °C. Se cargaron 10 µg de muestra no tratada en la ranura de la muestra junto a un marcador de alto rango de pI (GE Healthcare, cat#. 17047301V). El programa de electroforesis consistió en tres fases; enfoque inicial durante 10 minutos a 500 V seguido de 90 minutos a 1,500 V y finalmente una fase de enfoque a 2,000 V durante 10 minutos. Por consiguiente, el gel se fijó y se tiñó con un colorante de colonia coomassie (Pierce, cat#. 24590).

El análisis IEF de PG3056 y PG3055 dio como resultado el gel que se muestra en la Figura 1. Para PG3055 se observa una banda principal en pI alto (~ 9) con una banda de satélite a un valor pI algo más alto. PG3056 mostró un patrón de IEF similar, sin embargo, a valores de pI más altos sutiles y con una banda principal ligeramente más difusa.

60 Ambas IgG se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico HPLC (CEX-HPLC) para analizar su heterogeneidad de carga utilizando un método ortogonal. CEX-HPLC se realizó a temperatura ambiente en un sistema de HPLC Dionex equipado con una columna SP STAT de 7 µm y un detector UV/Vis. Se inyectaron 10 µg de muestra; se usó un gradiente de tampón fosfato 25 mM, pH 6.0, con una concentración creciente de NaCl para separar las variantes de carga del anticuerpo. Los datos fueron analizados utilizando el software Chromeleon.

Los cromatogramas CEX-HPLC de PG3055 y PG3056 se muestran en la Figura 2. PG3055 muestra un pico principal a los 18.8 minutos flanqueado por picos pequeños que representan isoformas ácidas y básicas de la IgG. Sorprendentemente, el cromatograma de PG3056 contiene múltiples picos en un gran intervalo de tiempo; Dos picos principales amplios son visibles a los 18.4 y 20.4 minutos. Los cromatogramas muestran una heterogeneidad de carga considerablemente aumentada del anticuerpo antiCD3 de cadena ligera común IGVK1-39/JK1 (PG3056) cuando se compara con la IgG con la cadena ligera 15C3 VL2 - IGKV1-13 (PG3055).

También se usó CEX-HPLC para evaluar la variabilidad y estabilidad de lote a lote de los anticuerpos anti-CD3. Ambos anticuerpos se analizaron después de haber estado almacenados a 2-8 °C durante más de 3 meses y después de un almacenamiento a largo plazo en -80 °C. La superposición de las muestras PG3055 (Figura 3, izquierda) muestra que se observa una pequeña diferencia entre las muestras; Las áreas de pico relativas de los picos menores a 17.1 minutos y 19.8 minutos cambian ligeramente al almacenarse a 2-8 °C durante un largo periodo de tiempo. Las diferencias observadas entre las muestras PG3056 (Figura 3 a la derecha) son mucho más sustanciales. El pico a los 20.4 minutos disminuye significativamente con el almacenamiento a 2-8 °C, mientras que el pico a los 18.4 minutos aumenta hasta convertirse en el pico principal de la muestra. Otros picos de elución temprana que representan otras isoformas ácidas de la IgG también muestran un aumento relativo en el área pico, por ejemplo, el pico a los 16.4 minutos. Los cambios observados en los cromatogramas de CEX-HPLC después de un almacenamiento prolongado a 2-8 °C indican que el anticuerpo anti-CD3 que contiene la cadena ligera común IGVK1-39/JK1 no es estable mientras se almacena en estas condiciones, mientras que el anticuerpo PG3055 que contiene la cadena ligera 15C3 VL2 - IGKV1-13 es mucho más estable.

Ejemplo 2: influencia de la variación de lote de anticuerpo PG3056 a lote en la unión del antígeno

Para evaluar la estabilidad de los anticuerpos anti-CD3 en presencia de suero, los anticuerpos PG3055 y PG3056 se diluyeron a 10 µg/ml en IMDM (Invitrogen, cat#. 21980-065) suplementado con FBS al 10% (PAA, cat#. A15-101) y posteriormente se incubó a 37 °C durante siete días. En este análisis se incluyó un control de isotipo IgG (PG1207). Después a los siete días, se evaluó la unión de las IgG a CD3 mediante análisis de citometría de flujo en linfocitos T purificados con MACS derivados de donantes sanos. Para la comparación, PG3055 y PG3056 almacenados en el mismo medio durante siete días a 2-8 °C se incluyeron en el análisis de citometría de flujo. La unión a CD3 de todos los anticuerpos se probó a concentraciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 µg/ml, diluidos en IMDM + 10% de FBS. Los anticuerpos unidos se visualizaron con un anticuerpo Fc antihumano de cabra (Southern Biotech, 2043-02), de acuerdo con el procedimiento FACS descrito anteriormente en el documento WO2014/051433 con la desviación de que la tinción se realizó IMDM + 10% FBS. Los datos muestran (Figura 4) que PG3055 y PG3056 mostraron una unión similar a los linfocitos T cuando se incubaron a 2-8 °C en presencia de suero. Mientras que la unión de PG3055 no se vio afectada por una incubación de siete días a 37 °C en IMDM + FBS al 10% (PG3055 vs PG3055 a 37 °C), la unión de PG3056 a CD3 en linfocitos T se redujo significativamente (PG3056 vs PG3056 a 37 °C).

En conclusión, PG3056, el anticuerpo anti-CD3 que contiene la cadena ligera común IGVK1-39/JK1, mostró unión fuertemente reducida a CD3 después de la incubación del suero a 37 °C durante 7 días. En contraste, el anticuerpo PG3055 retuvo la unión completa a CD3 en las mismas condiciones.

Ejemplo 3: ¿Cuál es la diferencia entre los anticuerpos PG3055 y PG3056?

Los anticuerpos PG3055 y PG3056 tienen secuencias idénticas, pero para la región variable de la cadena ligera. Aparentemente, la cadena ligera común no funciona bien en el contexto de las otras secuencias de aminoácidos del anticuerpo y en particular con la región variable de la cadena pesada con la que está en contacto íntimo. La forma más obvia de tratar de corregir la deficiencia del anticuerpo 3056 sería ver si la cadena ligera común puede alterarse de alguna manera para hacerla más similar a la cadena ligera en el anticuerpo 3055. Además, la cadena ligera del anticuerpo PG3056 no se seleccionó para formar parte del sitio de unión al antígeno que se une a la molécula CD3. La región variable de la cadena pesada fue seleccionada para ese propósito.

Esta es otra razón para ver si la cadena ligera común se puede hacer más parecida a la cadena ligera en el anticuerpo PG3055 principal.

Para averiguar dónde diferían las regiones variables PG3055 y PG3056 como resultado de las diferentes cadenas ligeras, se modelaron sus regiones Fab. Un modelo de homología de la región Fab de PG3056 y PG3055 se construyó utilizando MODELLER (Sali et al, 1993: J. Mol. Biol. 234, 779-815). Se seleccionó una estructura modelo con una puntuación de energía óptima del ensamble de estructuras generado. Los algoritmos de optimización de la cadena lateral y de minimización de energía se utilizaron para reemplazar las cadenas del lado de la plantilla cuando éstas diferían de la secuencia objetivo. Los modelos de homología de los Fabs 3055 y 3056 se inspeccionaron visualmente utilizando Yasara (<http://www.yasara.org>). La superposición de los modelos para PG3055 y PG3056 (Figura 5, imagen de la derecha) muestra que las diferencias de la secuencia en la cadena ligera solo causa unos pocos cambios estructurales; la orientación de algunas partes de la cadena ligera con respecto a la cadena pesada se cambia en cierta medida entre las dos IgG. Las partes cambiadas podrían ser inherentemente menos estables y ser la causa raíz de las diferencias de estabilidad observadas. Alternativamente, las partes cambiadas podrían ser más o menos susceptibles a diferentes procesos inductores de heterogeneidad. Varios procesos, conocidos y desconocidos, pueden ser la causa de las características

observadas para el anticuerpo PG3056. Las modificaciones enzimáticas y no enzimáticas incluyen la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, ciclación de glutamina N-terminal, procesamiento de lisina C-terminal, desamidación, oxidación, glicación y escisión de enlaces peptídicos entre los procesos que pueden causar heterogeneidad (Liu et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 97, 2426-2447 (2008)). Dependiendo del tipo de modificación, la heterogeneidad de los anticuerpos monoclonales puede introducirse mediante procesos intracelulares, procesos extracelulares, por ejemplo, que tienen lugar en suero, ascitis y/o medio de cultivo celular. La heterogeneidad también se puede introducir mediante la incubación con tampones, durante el proceso de purificación, el almacenamiento, en diferentes condiciones de estrés como la temperatura elevada o la exposición a la luz intensa.

El modelado no señaló a un aminoácido o región en particular para enfocar los esfuerzos de mutación de la región variable de PG3056. Las diferencias observadas entre los modelos de homología de PG3055 y PG3056 fueron menores.

En la presente invención se encontró que no hay necesidad de cambiar la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo PG3056. La adaptación de la cadena pesada puede producir un anticuerpo con buenas propiedades de unión, buena estabilidad y buena uniformidad, incluso cuando la cadena pesada está presente en una región variable con la cadena ligera común. Como se ejemplificará con más detalle a continuación en el presente documento, se encontró sorprendentemente que los cambios específicos en la región CDR2 de la cadena pesada se toleran con respecto a la unión y proporcionan al anticuerpo la estabilidad y uniformidad deseadas.

Los cambios dan como resultado un cambio en un motivo de desaminación NG en la región CDR2 de la cadena pesada. La región HCDR2 de PG3055 y PG3056 contiene residuos Asn54 y Gly55. Los residuos están expuestos en la superficie en ambos anticuerpos, como se muestra en la Figura 5. La posición estructural y la exposición en la superficie son muy similares en ambas moléculas, con una orientación ligeramente diferente para la cadena lateral de asparagina. Teniendo en cuenta que el motivo está expuesto en la superficie de ambos anticuerpos y, por lo tanto, es fácilmente accesible para el medio ambiente y que no parece haber diferencias significativas en el doblamiento del motivo HCDR2 NG en PG3055 versus P3056, se consideraría improbable que la desamidación mejorada de Asn54 en PG3056 sea la causa raíz de la variación de unión observada de los diferentes lotes de PG3056.

Ejemplo 4: Generación y caracterización de variantes PG3056

La caracterización analítica de PG3056 por CIEX-HPLC mostró que la IgG es altamente heterogénea. Como esta heterogeneidad podría obstruir la purificación basada en CIEX-HPLC de la IgG biespecífica CD3xCLEC12A, nuestro objetivo fue mejorar el perfil CIEX-HPLC del Fab MF3056. La región variable de la cadena pesada de MF3056 contiene varios residuos y/o motivos que podrían contribuir a la heterogeneidad de PG3056. Estos son el residuo de lisina C-terminal, un motivo de desamidación de asparagina NG en el HCDR2 y un motivo DP lábil ácido en el HCDR3 (consulte la Figura 6 para una alineación del MF3056\_VH frente a la secuencia de la línea germinal VH 3-33).

Aunque el modelado in silico no identificó en absoluto el motivo HCDR2 NG como causa probable de la heterogeneidad observada, se intentó identificar variantes de la VH de MF3056 que carecen de este motivo de modificación postraduccional, y que en paralelo pueden mostrarse un perfil de retención CIEX-HPLC mejorado, así como una estabilidad mejorada. Para este fin, se generaron y probaron las siguientes variantes de VH de MF3056: MF3872, MF3873 y MF3905 (Figura 7).

Estos Fab que contienen estas variantes de VH y la cadena ligera común (MF3872, MF3873 y MF3905) se expresaron como IgG monoclonal de longitud completa (PG3872, PG3873 y PG3905) y se analizaron para determinar la unión a CD3 expresado en membrana en células HPB-ALL por citometría de flujo (de acuerdo con el procedimiento FACS como se describe anteriormente en el documento WO2014/051433).

Se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 8):

Estos resultados muestran que las variantes PG3873 y PG3905 perdieron completamente la unión a CD3, mientras que la unión muy baja a CD3 se mantuvo para la variante PG3872.

Como un enfoque alternativo para obtener variantes mejoradas con heterogeneidad reducida y inmunogenicidad reducida, el VH de MF3056 se sometió a una línea germinal hacia la secuencia VH3-33 en varios residuos al hacer sustituciones de aminoácidos individuales o combinados. Se generaron las siguientes variantes de MF3056\_VH: MF3874\_VH, MF3878\_VH, MF3883\_VH, MF3886\_VH y MF3891\_VH (Figura 9).

Nuevamente, los Fab que contienen estas variantes VH y la cadena ligera común (MF3874\_VH, MF3878\_VH, MF3883\_VH, MF3886\_VH y MF3891\_VH) se expresaron como IgG monoclonal de longitud completa (PG3874, PG3878, PG3883, PG3886 y PG3891) y se probaron para unión a CD3 como se describió anteriormente. Se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 10):

Como se muestra en la Figura 10, todos los individuos (PG3874 (Q6E), PG3878 (V23A), PG3883 (A50V), PG3886 (T97A)) y las variantes de línea germinal combinadas (PG3891 (Q6E/V23A/T97A)) conservaron la capacidad de unión a CD3

completa. Posteriormente, se analizó PG3891 mediante CIEX-HPLC (como se describe en el ejemplo 1) para evaluar si la línea germinal había dado como resultado una heterogeneidad reducida.

5 Como se muestra en la Figura 11, el perfil CIEX-HPLC de PG3891 aún mostraba una heterogeneidad de carga significativa. Se obtuvieron perfiles CIEX-HPLC similares para las variantes de la línea germinal individuales (datos no mostrados).

10 En un próximo intento de reducir la heterogeneidad de carga de PG3056, las variantes MF3056\_VH que carecen del motivo HCDR2 NG se generaron (Figura 12).

15 Los Fabs que contienen estas variantes de VH y la cadena ligera común (MF5192-5197\_VH) se generaron y expresaron como IgG monoclonal de longitud completa (números de PG) y se analizaron para determinar la unión a CD3 expresado en la membrana en células de HPB-ALL mediante citometría de flujo como se describió anteriormente. Este análisis (Figura 13) mostró que PG5196 (N<sub>54</sub>G<sub>55</sub> en sustitución N<sub>54</sub>A<sub>55</sub>) retuvo la unión a CD3 comparable a PG3056, mientras que todas las demás variantes probadas de MF3056 mostraron una unión a CD3 significativamente reducida (PG5192, PG5193 o PG5197) o ninguna unión (PG5194 y PG5195).

20 Para evaluar la heterogeneidad de la carga del mAb PG5196, se realizó el enfoque isoelectrico como se describe en el ejemplo 1. Después de la tinción del gel, se observa una banda estrecha a pl alto para PG5196 con una banda de satélite menor a un valor pl algo más alto (ver Figura 14).

25 Para evaluar la heterogeneidad de carga de PG5196 con más detalle, se realizó CIEX-HPLC de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1, el cromatograma resultante se muestra en la Figura 15. El cromatograma muestra un pico principal con un tiempo de retención de 19 minutos, precedido por un pequeño pico a los 16.9 minutos. Sorprendentemente, estos datos demuestran que PG5196 muestra un perfil de heterogeneidad de carga significativamente mejorado en comparación con PG3056.

Ejemplo 5: Generación de variantes adicionales de PG5196 usando selecciones de presentación de fagos

30 Basado en el VF MF5196, se diseñaron bibliotecas de presentación de fagos con el objetivo de obtener Fab adicionales de unión a CD3 con una heterogeneidad de carga similarmente reducida. Se generaron bibliotecas de presentación de fagos que contenían la región VL IGKVI-39/IGKJ1 humana reorganizada (De Kruijff et al. Biotechnol Bioeng. 2010 (106) 741-50), y una colección de regiones VH basadas en MF5196 que incorporan sustituciones de aminoácidos que potencialmente podrían mejorar la interfaz VH/VL. Las sustituciones específicas y los aminoácidos alternativos permitidos por posición se indican en la Tabla 1. Por posición mutada, todas las sustituciones indicadas, así como el aminoácido original, se introdujeron en una proporción igual.

Tabla 1

Aminoácido y posición en MF5196_VH.	Región	Sustituciones introducidas por posición.
H35	FR2	FYASN
A50	FR2	ILFYNRQSK
N54	HCDR2	H
A55	HCDR2	GTN
D59	HCDR2	LIVFYRANEHST
A61	FR3	FNIHQRLRYE STDKV
Y102	HCDR3	ARNDCSEQGHILKMFPSTWV
N103	HCDR3	ARDCEQGHILKMFPSTWYV
W104	HCDR3	MFYHLIV
F105	HCDR3	WMYHLIV

40 Se seleccionaron bacteriófagos de estas bibliotecas de presentación de fagos en una o dos rondas usando células HBP-ALL y/o proteína CD3δε-Fc humana recombinante usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los fagos de unión se eluyeron químicamente y se usaron para volver a infectar las bacterias. Después de recoger una serie de colonias bacterianas supervivientes, los fagos se rescataron y se seleccionaron para unirse a los complejos CD3/TCR

expresados en la superficie celular mediante citometría de flujo. La PCR de Colonia se realizó para todos los fagos que mostraron unión a CD3 para amplificar y secuenciar las regiones VH.

El análisis de los genes VH reveló qué variantes de sustitución conservaban la unión a CD3. Las variantes seleccionadas de MF5196\_VH tuvieron las siguientes sustituciones: A50 en QSYL, D59 en LIVFRANEHST, A61 en NIHQLRYESTDKV y/o F105 en MY (Tabla 2). En contraste, en la Tabla 1, las sustituciones enumeradas en H35, Y102, N103 y W104 no se permitieron, ya que todas las variantes de unión a CD3 seleccionadas retuvieron el aminoácido original en las posiciones 35, 102, 103 y 104. Esto muestra que los residuos H35, Y102, N103 y W104 son aminoácidos críticos para la unión a CD3.

Los ejemplos de variantes de unión a CD3 de MF5196\_VH son MF5603\_VH, MF5616\_VH, MF5626\_VH, MF5630\_VH, MF5648\_VH, MF5661\_VH y MF5694\_VH, todo en combinación con la región VL IGKVI-39/IGKJI humano redispuesto. Las secuencias VH de estas MF se enumeran en la Figura 25. Las pruebas de estas variantes de MF en formato IgG mono-específico para la unión a CD3 expresado en membrana en células HPB-ALL, mediante citometría de flujo como se describe anteriormente, mostraron que todos estos ejemplos se unieron a CD3 (Figura 26). Como ejemplo de su estabilidad inherente, PG5661 se analizó mediante CIEHPPLC se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1, el cromatograma resultante se muestra en la Figura 27. El cromatograma muestra un pico principal con un tiempo de retención de aproximadamente 20 minutos, similar al perfil que se muestra para PG5196.

Tabla 2

Aminoácido y posición en MF5196_VH	Sustituciones introducidas en MF5196	Variantes MF5196 de unión a CD3 encontradas con sustituciones
A50	ILFYNRQSK	QSYL
D59	LIVFYRANEHST	LIVFRANEHST
A61	FNIHQLRYESTDKV	NIHQLRYESTDKV
F105	WMYHLIV	MY

Ejemplo 5B

Basado en el VH MF5196, se diseñaron bibliotecas de presentación de fagos con el objetivo de obtener Fabs de unión a CD3 estables adicionales. Se generaron bibliotecas de presentación de fagos que contenían la región VL de IGKVI-39/IGKJI humana reorganizada (De Kruif et al. Biotechnol Bioeng. 2010 (106) 741-50), y una colección de variantes de VH3-33 a las cuales la región CDR3 de cadena pesada de MF5196 fue fundido.

Se seleccionaron bacteriófagos de estas bibliotecas de presentación de fagos en una o dos rondas usando células HBP-ALL y/o proteína CD3δ $\epsilon$ -Fc humana recombinante usando procedimientos conocidos por un experto en la técnica. Los fagos de unión se eluyeron químicamente y se usaron para volver a infectar las bacterias. Después de seleccionar varias colonias bacterianas supervivientes, los fagos se rescataron y se seleccionaron para determinar su unión a los complejos CD3/TCR expresados en la superficie celular mediante citometría de flujo. Se realizó una PCR de colonias para todos los fagos que mostraron unión a CD3 para amplificar y secuenciar las regiones VH.

Los ejemplos de las variantes de unión a CD3 adicionales resultantes de MF5196\_VH son MF5351\_VH, MF5354\_VH y MF5356\_VH (enumeradas en la Figura 28), todas en combinación con la región de IGKVI-39/IGKJI VL humana reorganizada.

La prueba de estas variantes de MF en formato IgG mono-específico para unirse a CD3 expresado en membrana en células HPBALL, mediante citometría de flujo como se describió anteriormente, mostró que todos estos ejemplos se unieron a CD3 (Figura 29).

Ejemplo 6 Caracterización funcional del Fab MF5196 en el formato de IgG biespecífico CD3xCLEC12A

Para examinar la actividad funcional del Fab MF5196, este Fab CD3 y el Fab CD3 MF3056 se expresaron junto con el Fab MF4327 CLEC12A como el brazo fijo. Las IgG biespecíficas CD3xCLEC12A se expresaron en el formato de IgG biespecífica de longitud completa como se describe en el documento WO2014/051433, incluida la ingeniería de bisagra/CH2 inferior en las posiciones (referido como DM-Fc, doble mutación de CH2 en la región Fc). Al igual que MF3056 y MF5196, el MF4327 Fab utiliza la cadena ligera humana IGKVI-39/IGKJI. La secuencia Fab de MF4327 se proporciona en la solicitud de patente WO2014/051433. Primero, la unión de 5196x4327 DM-Fc bsAb a CD3 y CLEC12A se demostró mediante citometría de flujo utilizando células CD3 + HPBALL y células CLEC12A + HL-60 (según los procedimientos descritos anteriormente en el documento WO2014/051433). Los 3056x4327 DM-Fc bsAb se incluyó como referencia y un

control de isotipo IgG1 irrelevante, PG1337, se incluyó como control (figura 16). Ambos CD3xCLEC12A DM-Fc bsAbs unidos CD3 expresados y HPB-ALL con unión ligeramente mejorada para 5196x4327 DM-Fc bsAb.

5 A continuación, se probó la actividad funcional de 5196x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb. Primero, se investigó la capacidad estimuladora de los linfocitos T con linfocitos T en reposo de donantes sanos. Los linfocitos T en reposo purificados se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente WO2014/051433. Los linfocitos T en reposo purificados se incubaron posteriormente con células de la línea celular HL-60 derivada de leucemia en suero humano (HS) al 10% a una relación de células efectoras/diana de 5: 1 durante dos días como se describe en el documento WO2014/051433. El 3056x4327 DM-Fc bsAb se incluyó como referencia. Como IgG de referencia de control negativo se incluyeron una IgG de control de isotipo (IgG de control) y el bsAb 5196x1337 DM-Fc. El bsAb 5196x1337 DM-Fc se une a CD3 con un brazo (MF5196) y se une al toxoide tetánico (TT) con el segundo brazo (MF1337) y se incluye para examinar la actividad inducida fuera del objetivo potencial por MF5196. El bsAb y las IgG de control se probaron a 1,000 ng/mL. Los datos de activación de linfocitos T se expresan como el porcentaje de células positivas para CD69 dentro de la población de linfocitos T positivos CD4 o positivos CD8 (Figura 17). El 5196x4327 DM-Fc bsAb indujo la activación de linfocitos T CD4 y CD8 como se refleja en la regulación positiva al alza del marcador de activación temprana CD69. Además, el bsAb 3056x4327 DM-Fc indujo la regulación positiva de CD69 en linfocitos T CD4 y CD8, pero en menor medida en comparación con el bsAb 5196x4327 DM-Fc. La regulación positiva observada de CD69 en ambos subconjuntos de linfocitos T fue específica para el antígeno CLEC12A ya que el bsAb 5196x1337 DM-Fc no indujo la regulación positiva de CD69.

20 Este análisis mostró que el bsAb DM-Fc 5196x4327 tenía la capacidad de inducir la activación específica de antígeno de linfocitos T CD4 y CD8, ligeramente mejor que el bsAb DM-Fc 3056x4327 (Figura 17). La activación de linfocitos T inducida por 5196x4327 DM-Fc bsAb fue específica de CLEC12A ya que el control 5196x1337 DM-Fc bsAb no indujo activación de células T. Tomados en conjunto, esto muestra que el HCDR2 N en una sustitución de aminoácidos A, resultando en un Fab MF5196 que se une al CD3, retiene completamente la activación de los linfocitos T específicos de CLEC12A

25 Para investigar si el grado de activación de linfocitos T por 5196x4327 versus 3056x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb fue suficiente para inducir la lisis de células diana, las células HL-60 se marcaron con diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) y cocultivado con linfocitos T de donante sano en la relación de célula efectora: diana de 5: 1 en presencia de 10% de HS. El 5196x1337 CD3xTT DM-Fc bsAb se incluyó para examinar la posible lisis fuera del objetivo. Las IgG biespecíficas se analizaron en un rango de dilución de 4 veces, comenzando a 1,000 ng/ml. Después de dos días, las células HL-60 positivas para CFSE sobrevivientes se cuantificaron mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de lisis específica relacionada con la condición de control de PBS (Figura 18).

30 Este análisis mostró que el bsAb 5196x4327 DM-Fc había retenido completamente la capacidad de inducir la lisis de células diana específicas del antígeno CLEC12A. Sorprendentemente, la potencia de 5196x4327 DM-Fc fue significativamente mejor que 3056x4327 DM-Fc bsAb.

35 En conclusión, este ejemplo mostró que el Fab MF5196 es funcional como 5196x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb indujo eficientemente la activación de linfocitos T específicos de antígeno CLEC12A y la lisis de células CLEC12A + HL-60. Además, este ejemplo mostró que el 5196x4327 DM-Fc bsAb tiene una potencia mejorada en comparación con el 3056x4327 DM-Fc bsAb.

Ejemplo 7

45 Afinidad de los brazos anti-CD3 y anti-CLEC12A de 5196x4327 DM-Fc bsAb

Las afinidades de los Fab MF5196 CD3 y MF4327 CLEC12A para sus dianas se midieron mediante tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) utilizando un BIAcore T100. Un anticuerpo monoclonal de ratón IgG humano (Becton y Dickinson, cat. Nr. 555784) se acopló a las superficies de un chip sensor CM5 usando química de aminos libres (NHS/ EDC). Luego, el 5196x4327 DM-Fc bsAb se capturó en esta superficie del sensor. Posteriormente los antígenos purificados recombinantes CLEC12A humano (Sino Biological Inc, cat. Nr. 11896-H07H) y la proteína CD3δε-Fc humana se ejecutaron sobre la superficie del sensor en un rango de concentración para medir las tasas de activación y desactivación. Después de cada ciclo, la superficie del sensor se regeneró mediante un pulso de HCl y se capturó de nuevo 5196x4327 DM-Fc bsAb. A partir de los sensogramas obtenidos, las tasas de activación y desactivación se determinaron utilizando el software de evaluación BIA.

Estos datos (Figura 19) mostraron que 5196x4327 DM-Fc bsAb tenía una afinidad por 3 nM para CLEC12A humano y una afinidad de 177 nM para CD3. Esto demostró que la afinidad del brazo CLEC12A era aproximadamente 60 veces mayor que la afinidad del brazo de unión a CD3 humano en el 5196x4327 DM-Fc bsAb.

60 Tabla 3: Tasas de activación y desactivación y valores de afinidad para la unión a CD3 humano y CLEC12A humano. El valor es el promedio de tres mediciones. KD: constante de afinidad (disociación de equilibrio).

Antígeno	KD (M)
----------	--------

CLEC12A	$3 \times 10^{-9}$
CD3 $\delta$ $\epsilon$ -Fc	$177 \times 10^{-9}$

Ejemplo 8 Eficacia de 5196x4327 DM-Fc bsAb para inducir la lisis de blastos de AML en las muestras de pacientes con AML primario

5 Se mostró en el ejemplo 6 que el 5196x4327 DM-Fc bsAb induce potentemente la lisis de células diana HL-60 por linfocitos T derivados de donantes sanos. En la patente WO2014/051433, los inventores mostraron que un CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb tenía la capacidad de inducir la lisis de blastos de AML por linfocitos T derivados de pacientes con AML autóloga a una relación efector diana 5: 1. Aquí se analizó la eficacia de un CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb, más específico de 10 5196x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb, para inducir la lisis de blastos de AML en muestras de AML primarias con baja relación efectora diana, linfocitos T a blastos de AML.

Las muestras de pacientes con AML tomadas en el momento del diagnóstico (de las clasificaciones FAB AML M1, M2, M4, M4/M5, Tabla 4) se descongelaron y se caracterizaron por la fracción de linfocitos T y blastos de AML mediante análisis de citometría de flujo para CD4, CD8, CD14, CD33, CD34, CD45 y 7AAD. Las muestras de AML analizadas tenían una relación de efector a diana de 1: 7-1: 40.

Posteriormente, las muestras de médula ósea del paciente con AML primaria se cultivaron en medio IMDM suplementado con un 10% de HS normal más 20 ng/ml de IL-15 (Miltenyi, # 130-095-766), 2.5 ng/ml de GM-CSF (Immunotools, # 11343125), 12.5 ng/mL G-CSF (descrito en Norde et al., 2009), 6.25 ng/mL IL-3 (Immunotools, # 11340035), 3.0 ng/mL SCF (Immunotools, # 11343325) y 2.5 ng/mL Flt3L (Immunotools, # 311340035). Las condiciones probadas incluyeron PBS, control de isotipo Ab WT-Fc, 5196x4327 DM-Fc bsAb, 5196x1337 DM-Fc bsAb y control positivo CD3 WT-Fc Ab (todos los anticuerpos a 1,000 ng/mL). Después de siete días de cultivo, la expansión de linfocitos T y la destrucción de AML se determinaron mediante análisis de citometría de flujo utilizando los mismos marcadores que se usaron en el día 0. Los resultados se expresaron como las veces de expansión de linfocitos T o la frecuencia de la lisis por blastos de AML en relación con la condición de PBS.

Estos datos demostraron (Tabla 4 y Figura 20) que 5196x4327 DM-Fc bsAb indujo eficazmente la expansión de linfocitos T (5 a 30 veces la expansión de linfocitos T) después de 7 días. Más importante aún, estos datos mostraron que el 5196x4327 DM-Fc bsAb indujo de manera eficiente la lisis (26-88%) de las células tumorales de AML en muestras de 30 pacientes ensayadas 5/5 aún en las muestras de AML con relaciones efector a diana muy bajas.

Tabla 4

Paciente#	Relación E:T en el día 0	Clasificación AML FAB	% de muerte de Blastos (después de 7 días)	Veces de la expansión de linfocitos T (después de 7 días)
#1	1:21	M4/M5	26%	30
#2	1:10	M4	44%	8
#3	1:7	M2	88%	4
#4	1:39	M4/M5	65%	6
#5	1:40	M1	83%	6

35 La eficacia del 5196x4327 DM-Fc bsAb para inducir la proliferación de linfocitos T y la lisis de blastos de AML se analizó en muestras adicionales de pacientes con AML tomadas en el momento del diagnóstico.

Las muestras de pacientes con AML tomadas en el momento del diagnóstico (de las clasificaciones FAB AML M1, M2, M4, M4/M5, Tabla 5) se descongelaron y se caracterizaron por la fracción de linfocitos T y blastos de AML por análisis de citometría de flujo para CD4, CD8, CD14, CD33, CD34, CD45 y 7AAD. Las muestras de AML analizadas tenían una relación de efector a diana que oscilaba entre 1: 3-1: 97. Posteriormente, las muestras primarias de pacientes con AML se cultivaron como se describió anteriormente en el ejemplo 8. Las condiciones analizadas incluyeron PBS, control de isotipo Ab WT-Fc, 5196x4327 DM-Fc bsAb, 5196x1337 DM-Fc bsAb y control positivo CD3 WT-Fc Ab (todos anticuerpos a 200 ng/mL). Después de siete y diez días de cultivo, la expansión de los linfocitos T y la muerte de blastos de AML se 45 determinaron mediante análisis de citometría de flujo utilizando los mismos marcadores que se usaron en el día 0. Los resultados se expresaron como la expansión de linfocitos T o la frecuencia de la lisis de blastos de AML en relación con la condición de PBS.

Estos datos demostraron (Tabla 5) que 5196x4327 DM-Fc bsAb indujo eficazmente la expansión de linfocitos T (7-226 veces la expansión de linfocitos T) después de 10 días. Más importante aún, estos datos mostraron que el 5196x4327 DM-Fc bsAb de manera eficiente indujo la lisis de (38-99%) de las células tumorales de AML del paciente en 6/8 muestras de pacientes con AML primaria analizadas, incluso en muestras de AML con un efector muy bajo a proporciones diana de 1: 45-1: 97.

Tabla 5

Paciente #	Relación E: T en el día 0	clasificación AML FAB	Clasificación de riesgo de AML	% de muerte de blastos (después de 10 días)	Veces de la expansión de linfocitos T (después de 10 días)
#6	1:45	M1	Buena	95%	20
#7	1:3	M2	Buena	99%	39
#8	1:17	M2	Pobre	87%	226
#9	1:94	M4	Pobre	0%	7
#10	1:46	M4/M5	Pobre	38%	23
#11	1:97	M4/M5	Pobre	39%	55
#12	1:31	M4/M5	Intermedio	0%	9
#13	1:15	M4/M5	Intermedio	67%	130

#### 10 Ejemplo 9

Se usó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para medir la estabilidad térmica de los dominios de las IgG descritos aquí. Los experimentos de DSC se realizaron en un MicroCal VP-DSC utilizando el software Origin v7.0 (VPViewer y el VPAnalyzer). Se analizaron los anticuerpos que se dializaron primero contra un tampón de fosfato 10 mM, NaCl 150 mM en muestras de IgG con pH 6.5 a una concentración de proteína de 0.25 mg/ml según lo determinado por la absorción de UV, el tampón de diálisis se utilizó como muestra de referencia. Las exploraciones se realizaron desde 50 °C a 95 °C con una velocidad de exploración de 1 °C/min y se analizaron con el software GraphPad Prism 5 y Microsoft Excel 2010.

El análisis DSC de tipo silvestre (WT) IgG1 dio como resultado dos picos como se muestra en la Figura 21 (indicado como WT | WT para CH2 | CH3). Tm1 a 70.9 °C corresponde a la fusión del dominio CH2, mientras que el pico a 85.0 °C (Tm2) representa la fusión de los Fabs y el dominio CH3. El gráfico DSC de una IgG1 con Fab idénticos que comprenden dos mutaciones (L235G, G236R) en el dominio CH2 (DM | WT) muestra un pico de Tm2 muy similar a 85.0 °C. Sin embargo, el pico Tm1 se ha desplazado a 73.5 °C, lo que indica que estas mutaciones aumentan significativamente la estabilidad del dominio CH2. Dado que el dominio CH2 no solo es el dominio más frágil de un WT IgG1, sino también de un IgG1 biespecífico diseñado por CH3, se puede concluir que el dominio CH2, diseñado por ingeniería L235G G236R también confiere estabilidad adicional a los anticuerpos biespecíficos de IgG CD3xCLEC12A que llevan Mutaciones CH2.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une a CD3 humano cuyo anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera en donde dicha cadena pesada comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA IWYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>  
 RKQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT GYNWF DPWGG  
 GTLVT VSS

con 0-5 sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones distintas de la posición indicada por X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> y distintas de las regiones CDR;

en donde

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = A;

X<sub>1</sub> = N y X<sub>2</sub> = T;

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = G;

X<sub>1</sub> = D y X<sub>2</sub> = G; o

X<sub>1</sub> = H y X<sub>2</sub> = A; y dicha cadena ligera comprende la región variable de la cadena ligera O12/IgVκ1-39 de la figura 23A con 0-5 sustituciones de aminoácidos.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicha región variable de la cadena ligera es una región variable de la línea germinal O12/IgVκ1-39\*01.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que la región variable de la cadena ligera comprende la cadena ligera kappa IgVκ1-39\*01/IGJk1\*01 o IgVκ1-39\*01/IGJk5\*01.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que la región variable de la cadena ligera comprende la cadena ligera kappa de línea germinal IgVκ1-39\*01/IGJk1\*01 o IgVκ1-39\*01/IGJk5\*01.

5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicha región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos.

DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI  
 SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK o DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP  
 GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK con 0-5 inserciones de aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de ellas.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es un anticuerpo biespecífico.

7. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 6, que comprende una combinación de cadena H/L de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y una combinación de cadena H/L que se une a un antígeno tumoral.

8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 7, en el que dicha combinación de cadena H/L que se une a un antígeno tumoral se une a CLEC12A.

9. El anticuerpo o anticuerpo biespecífico de las reivindicaciones 1-8, que comprende una región constante humana y dominios variables humanos.

10. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina diferentes con dominios de heterodimerización compatibles.

11. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 10, en el que dichos dominios de heterodimerización compatibles son dominios de heterodimerización CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina compatibles.

12. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que dicho anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG con un CH2 mutante y/o un dominio de bisagra inferior de tal manera que se reduce la interacción del anticuerpo IgG biespecífico con un receptor Fc-gamma.

13. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 12, en el que el CH2 mutante y/o el dominio de la bisagra inferior comprenden una sustitución amino en la posición 235 y/o 236 (numeración de Kabat), preferiblemente una sustitución L235G y/o G236R.
- 5 14. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12, que comprende una región variable de cadena ligera O12/IgVk1-39 de la figura 23A con inserción de 0-5 aminoácidos, supresiones, sustituciones, adiciones o una combinación de los mismos.
- 10 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

Figura 1

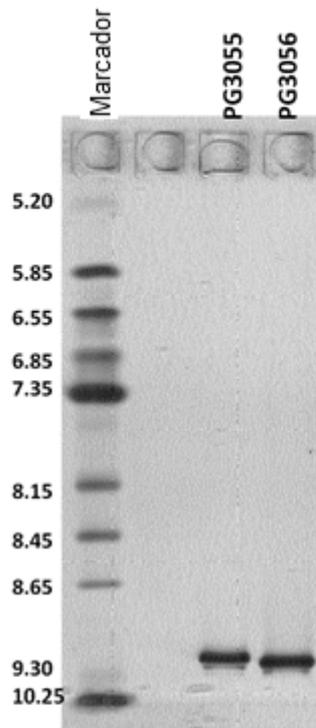


Figura 2

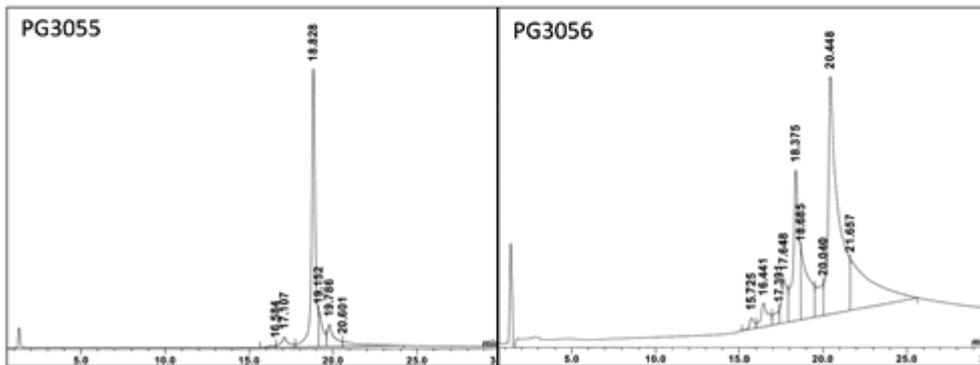


Figura 3

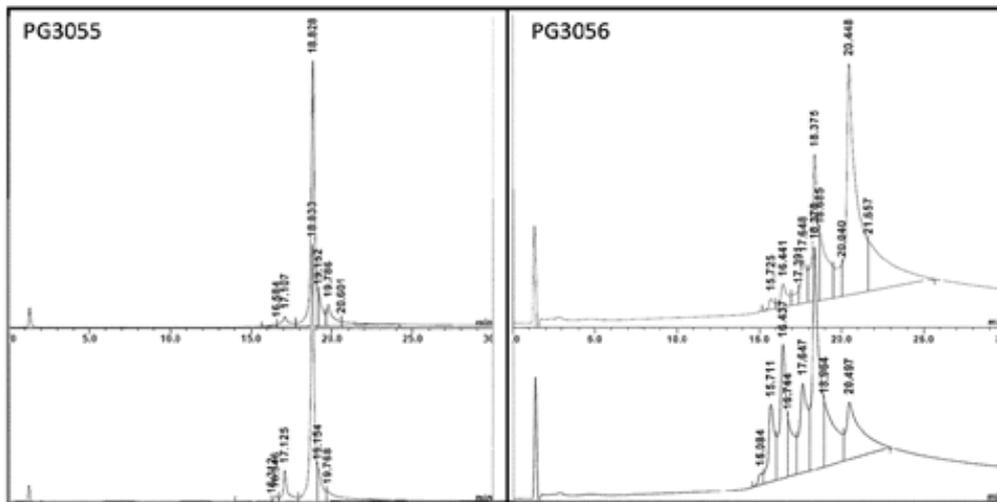


Figura 4

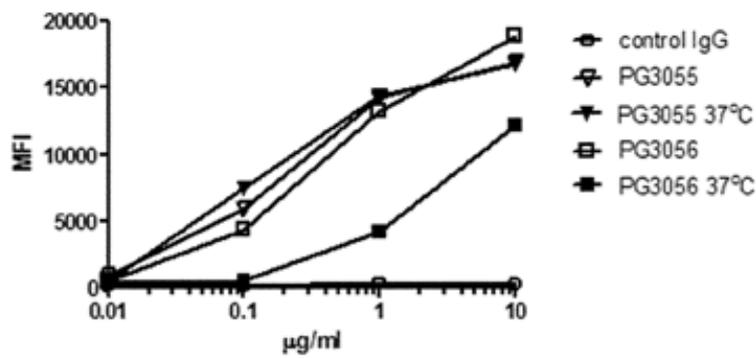


Figura 5

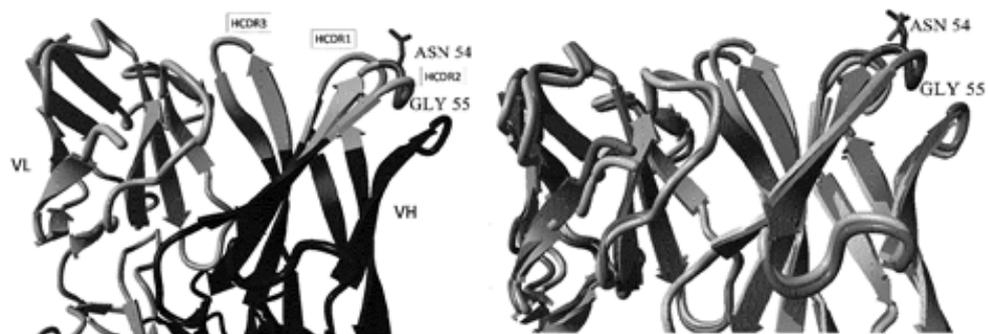


Figura 6

		1		50
3-33_VH	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS	CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK	GLEWVAV
MF3056_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWVRQAPGK	GLEWVAA
Consensus	(1)	QVQLV SGGGVVQPGRSLRLS	ASGFTFSSYGMHWVRQAPGK	GLEWVA
		51		100
3-33_VH	(51)	IWYDGSNKYYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	CAR--
MF3056_VH	(51)	IWY <u>NGR</u> KQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	CTRGT
Consensus	(51)	IWY G YADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	C R
		101	115	
3-33_VH	(99)	-----		
MF3056_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTV		
Consenso	(101)			

Figura 7

		1		50
MF3056_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWVRQAPGK	GLEWVAA
MF3872_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWVRQAPGK	GLEWVAA
MF3873_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWVRQAPGK	GLEWVAA
MF3905_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLS	CVASGFTFSSYGMHWVRQAPGK	GLEWVAA
		51		100
MF3056_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	CTRGT
MF3872_VH	(51)	IWY <u>S</u> GRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	CTRGT
MF3873_VH	(51)	IWY <u>Q</u> GRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	CTRGT
MF3905_VH	(51)	IWY <u>G</u> GRKQDYADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	CTRGT
		101	118	
MF3056_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS		
MF3872_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS		
MF3873_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS		
MF3905_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS		

Figura 8

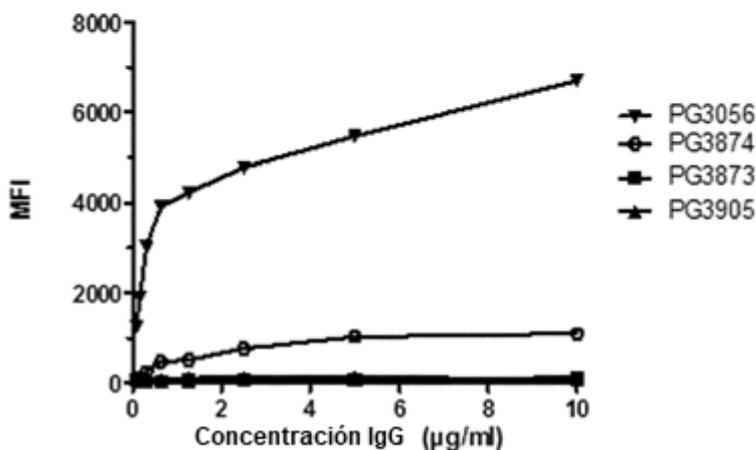


Figura 9

	1	50
MF3056_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF3874_VH	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF3878_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF3883_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV
MF3886_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF3891_VH	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
<b>Consenso</b>	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
	51	100
MF3056_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF3874_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF3878_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF3883_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF3886_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGT
MF3891_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGT
<b>Consenso</b>	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
	101	118
MF3056_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS
MF3874_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS
MF3878_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS
MF3883_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS
MF3886_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS
MF3891_VH	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS
<b>Consenso</b>	(101)	GYNWFDPWGQGLVTVSS

Figura 10

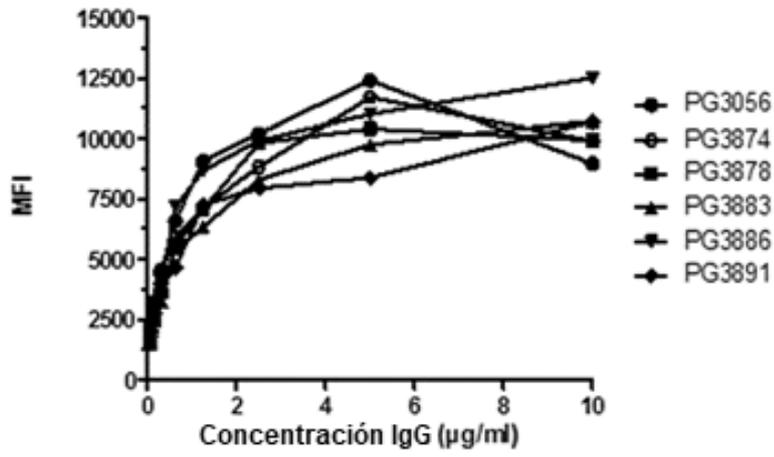


Figura 11

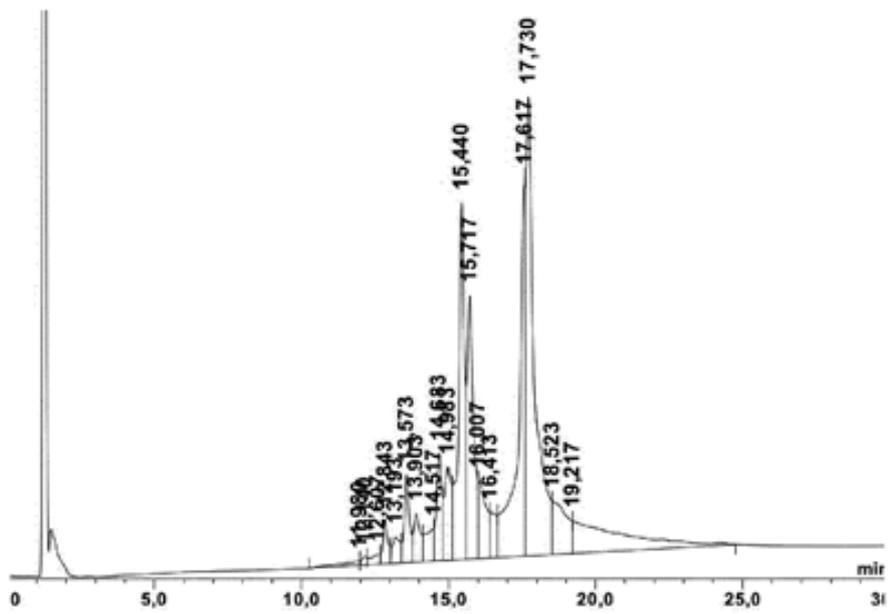


Figura 12

		1	50
MF3056_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5192_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5193_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5194_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5195_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5196_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
MF5197_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
Consenso	(1)	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA	
		51	100
MF3056_VH	(51)	IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5192_VH	(51)	IWYHGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5193_VH	(51)	IWYHARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5194_VH	(51)	IWYHTRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5195_VH	(51)	IWYHNRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5196_VH	(51)	IWYHARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
MF5197_VH	(51)	IWYHTRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
Consenso	(51)	IWYHARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT	
		101	118
MF3056_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	
MF5192_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	
MF5193_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	
MF5194_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	
MF5195_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	
MF5196_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	
MF5197_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	
Consenso	(101)	GYNWFDPPWGQGITLVTVSS	

Figura 13

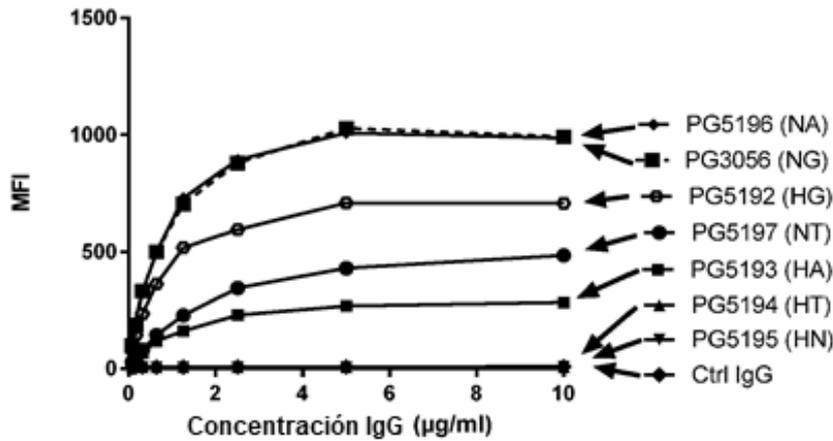


Figura 14

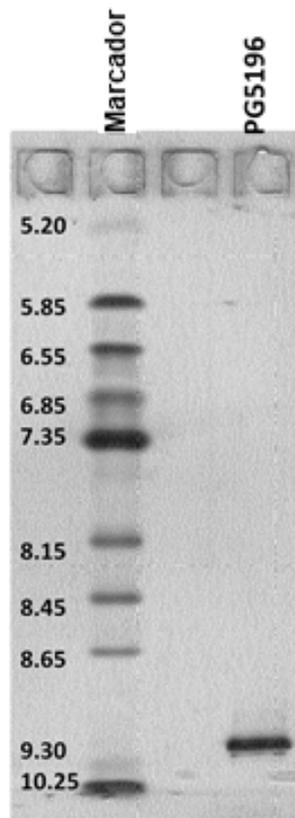


Figura 15

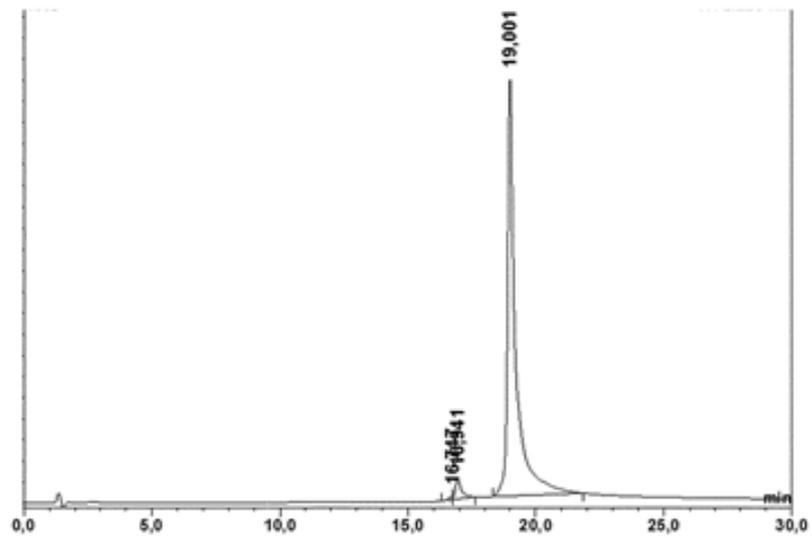


Figura 16

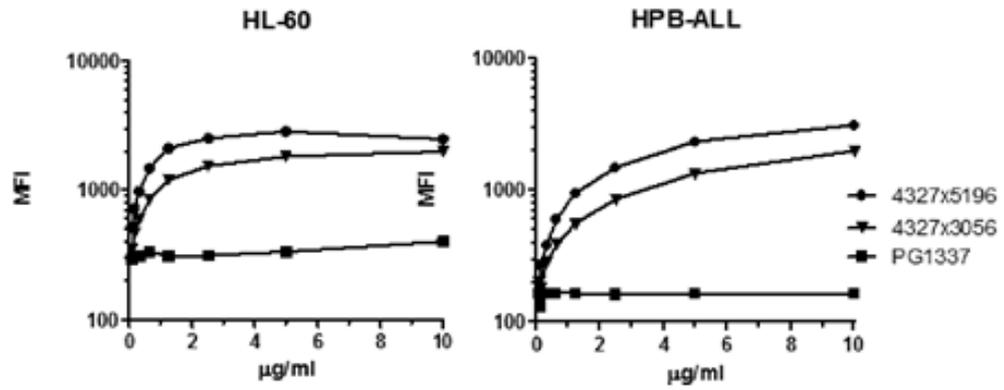


Figura 17

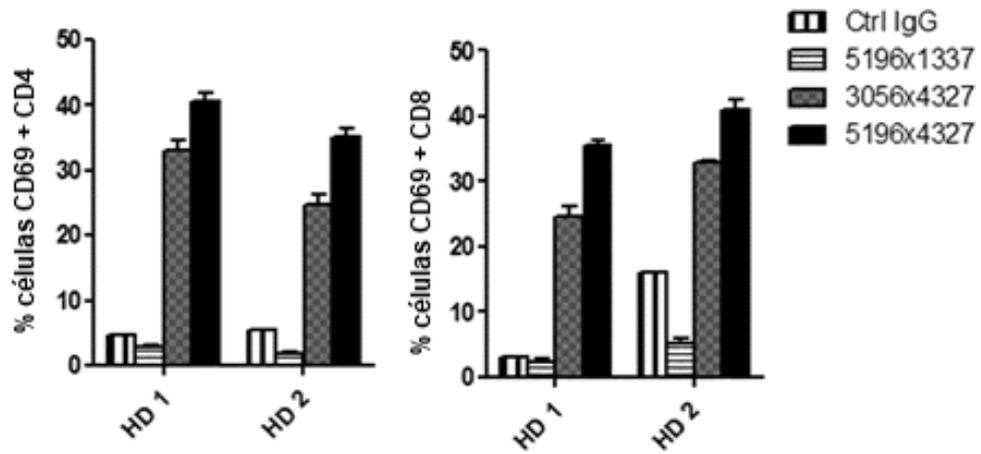


Figura 18

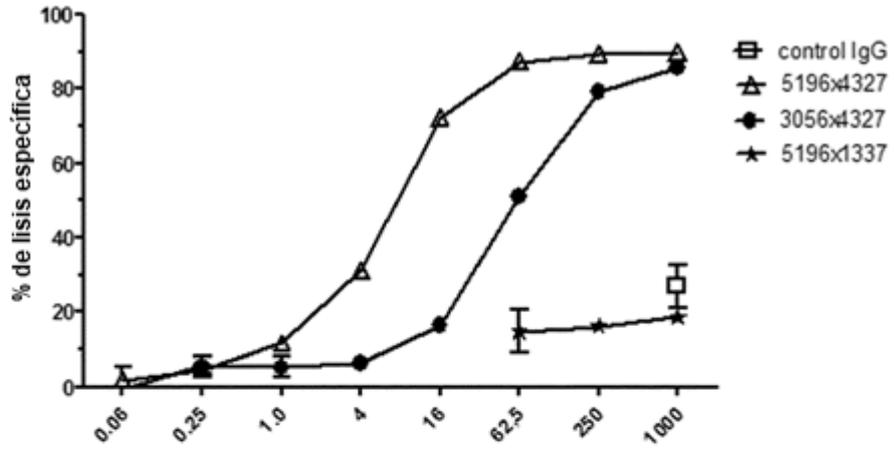


Figura 19

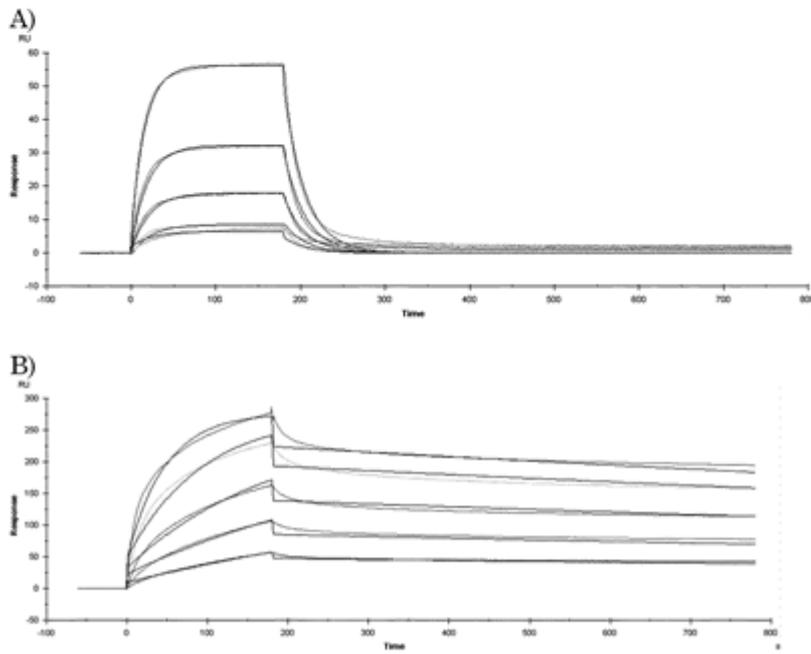


Figura 20

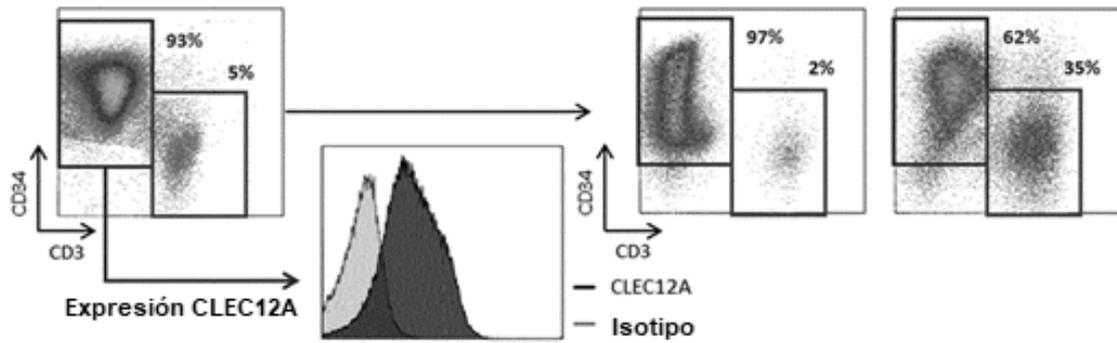
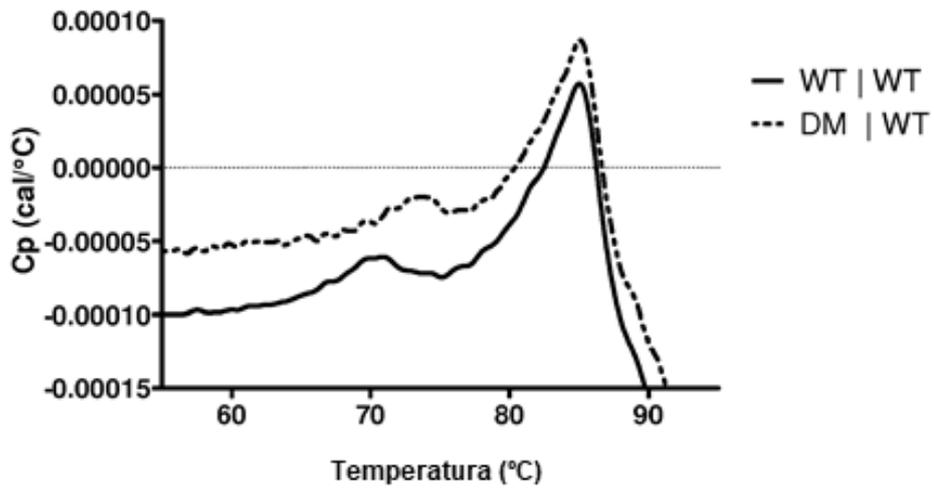


Figura 21



Muestra	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
WT   WT	70.9	85.0
DM   WT	73.5	85.0

Figura 22

15C3 VH (MF3055\_VH)

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNGRKKDYADSV  
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTIVTSS

15C3 VL1 - IGKV3-11\*

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPASFSG  
SGSGTDFLTITISLQPEDFAVYYCQQRSNWPWTFGQGTKVEIK

15C3 VL2 - IGKV1-13 (MF3055\_VL)

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSG  
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQFNSTPITFGQGRLEIK

IGKV1-39 (MF3056\_VL)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG  
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQSYSTPPTFGQGTKVEIK

Figura 23

Figura 23A

IGKV1-39A

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG  
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQSYSTP

Figura 23B

IGKV1-39/jk1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG  
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQSYSTPPTFGQGTKVEIK

Figura 23C

IGKV1-39/jk5

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG  
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQSYSTPPTFGQGRLEIK

Figura 24

MF1337\_VH

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWGMWMSANTGNTGYAQKFQGRVTM  
TRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHPALDVWGQGTIVTSS

MF4327\_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMIINPSSGTSYAQKFQGRVTM  
TRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAKGTGDFWYWGQGLTIVTSS

Figura 25

	1	50
MF5196_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5603_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5616_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5626_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5630_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5648_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5661_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ
MF5694_VH	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
<b>Consenso</b>	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
	51	100
MF5196_VH	(51)	IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5603_VH	(51)	IWYNARKQEYIDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5616_VH	(51)	IWYNARKQEYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5626_VH	(51)	IWYNARKQEYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5630_VH	(51)	IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5648_VH	(51)	IWYNARKQEYLD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5661_VH	(51)	IWYNARKQEYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
MF5694_VH	(51)	IWYNARKQEYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
<b>Consenso</b>	(51)	IWYNARKQEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
	101	118
MF5196_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS
MF5603_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS
MF5616_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS
MF5626_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS
MF5630_VH	(101)	GYNWYDPWGQGTILVTVSS
MF5648_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS
MF5661_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS
MF5694_VH	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS
<b>Consenso</b>	(101)	GYNWFDPPWGQGTILVTVSS

MF5196\_VH QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGTILVTVSS

MF5603\_VH  
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYIDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGTILVTVSS

MF5616\_VH  
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYND SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGTILVTVSS

MF5626\_VH  
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGTILVTVSS

MF5630\_VH  
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWYDPWGQGTILVTVSS

MF5648\_VH  
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNARKQEYLD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGTILVTVSS

MF5661\_VH

# ES 2 693 596 T3

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQI WYNARKQEYSDSVKGRFTI  
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTYNWFDPWGQGTLVTVSS

MF5694\_VH

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAI WYNARKQEYSDSVKGRFTI  
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTYNWFDPWGQGTLVTVSS

Figura 26

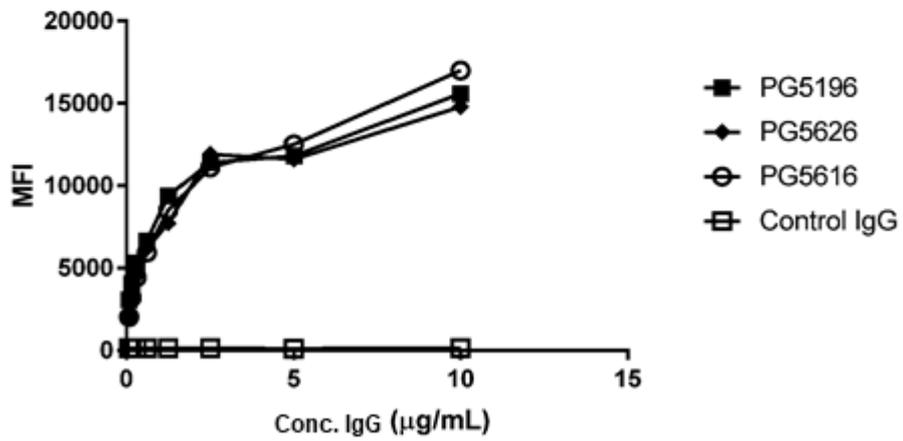
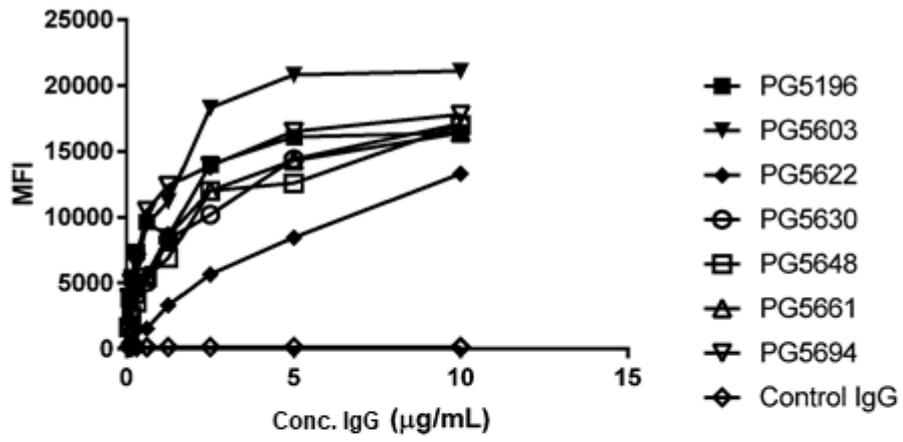


Figura 27

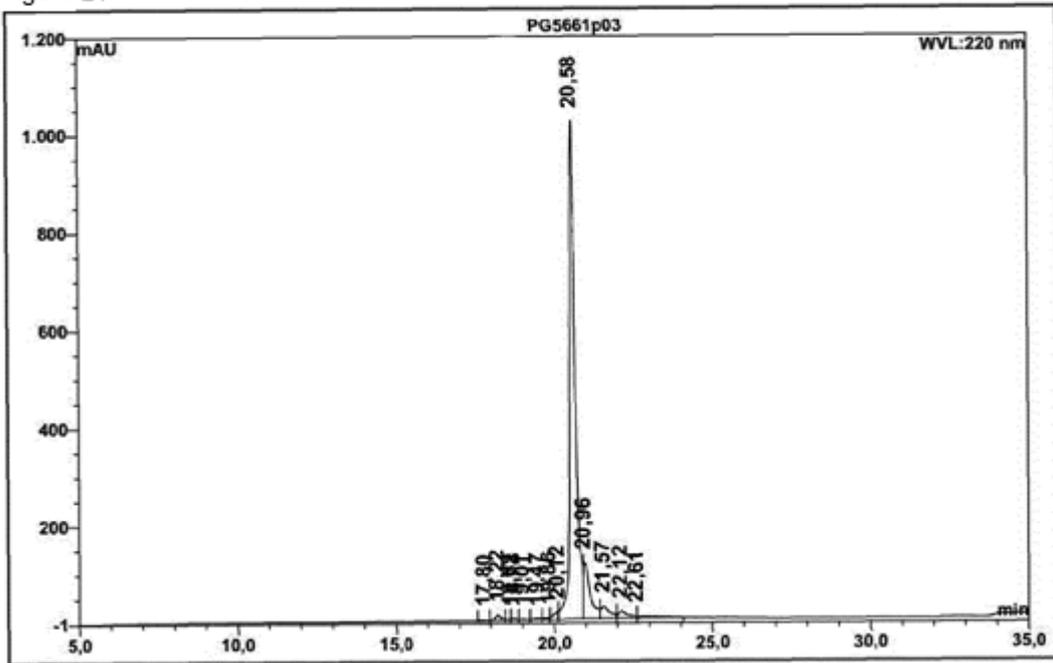


Figura 28

		1		50
MF5196	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA		
MF5351	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAM		
MF5354	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ		
MF5356	(1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ		
<b>Consenso</b>	(1)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ		
		51		100
MF5196	(51)	IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT		
MF5351	(51)	IWYDGNKNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT		
MF5354	(51)	IYYDGSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT		
MF5356	(51)	IWHDGRKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT		
<b>Consenso</b>	(51)	IWYDGRKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT		
		101		118
MF5196	(101)	GYNWFDPWGQGTLVTVSS		
MF5351	(101)	GYNWFDPWGQGTLVTVSS		
MF5354	(101)	GYNWFDPWGQGTLVTVSS		
MF5356	(101)	GYNWFDPWGQGTLVTVSS		
<b>Consenso</b>	(101)	GYNWFDPWGQGTLVTVSS		

MF5351\_VH

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAMIWYDGNKNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTLVTVSS

MF5354\_VH

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIYYDGSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTLVTVSS

MF5356\_VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIWHHDGRKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTLVTVSS

Figura 29

