

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 156**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2015 PCT/US2015/021322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15143079**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2015 E 15714116 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3119808**

54 Título: **Composiciones de anticuerpos para el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

**19.03.2014 US 201461955663 P**

**18.04.2014 US 201461981641 P**

**03.06.2014 US 201462007385 P**

**05.08.2014 US 201462033460 P**

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

**03.04.2020**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**DAVIS, SAMUEL;**  
**SMITH, ERIC;**  
**VARGHESE, BINDU;**  
**KIRSHNER, JESSICA R. y**  
**THURSTON, GAVIN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 752 156 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

Composiciones de anticuerpos para el tratamiento de tumores

## 5 LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud incluye un listado de secuencias en forma legible por ordenador en un archivo llamado A0015WO01-Sequence.txt creado el 4 de marzo de 2015 (83.454 bytes), que se incorpora en el presente documento como referencia.

10

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos, que se dirigen a los antígenos CD20 y CD3, para su uso en métodos de destrucción de tumores. Se divulgan métodos de reducción y/o control de las funciones efectoras que pueden ser el resultado de la unión del Fc asociada con las terapias con anticuerpos para el tratamiento de tumores.

15

**Antecedentes**

Las estrategias de anticuerpos con doble direccionamiento se están aplicando a enfermedades complejas en que la modulación multifactorial tiene como objetivo mejorar la eficacia terapéutica. CD20 es una fosfoproteína no glucosilada que se expresa en las membranas celulares de los linfocitos B maduros. CD20 se considera un antígeno asociado a tumores de linfocitos B debido a que se expresa en más del 95 % de los linfomas no Hodgkin (los LNH) de linfocitos B y en otras neoplasias malignas de linfocitos B, pero está ausente en linfocitos B precursores, en células dendríticas y en células plasmáticas. Los métodos para tratar el cáncer mediante el direccionamiento a CD20 son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico rituximab se ha utilizado o sugerido para su uso en el tratamiento de cánceres tales el LNH, la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP). Se cree que los anticuerpos anti-CD20 destruyen a las células tumorales que expresan CD20 mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, forma siglada de *complement dependent cytotoxicity*), por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, forma siglada de *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*) y/o por inducción de apoptosis y sensibilización a la quimioterapia, aunque algunos pacientes mostraron desarrollar resistencia o presentar respuestas incompletas a la terapia anti-CD20 (por ejemplo, resistencia al rituximab).

20

25

30

35

CD3 es un antígeno homodimérico o heterodimérico que se expresa en los linfocitos T en asociación con el complejo del receptor de linfocitos T (TCR), y es necesario para la activación de los mismos. El CD3 funcional se forma a partir de la asociación dimérica de dos de cuatro cadenas distintas: épsilon, zeta, delta y gamma. Los anticuerpos biespecíficos que tienen la capacidad de unirse a CD3 y a un antígeno diana, tales como CD20, se han propuesto para usos terapéuticos que implican el direccionamiento de respuestas inmunitarias de linfocitos T a tejidos y células que expresan el antígeno diana.

40

Un anticuerpo biespecífico que tiene un brazo de unión a CD20 y un brazo de unión a CD3 puede proporcionar la comunicación cruzada necesaria para aumentar la actividad antitumoral. Una tercera modalidad en tal anticuerpo biespecífico es el dominio Fc. La modificación de las propiedades de unión del Fc puede aumentar aún más la potencia antitumoral de un anticuerpo terapéutico.

45

La unión de un dominio Fc de inmunoglobulina a su receptor da como resultado una diversidad de respuestas de señalización e inmunitarias. Estas diversas "funciones efectoras", tales como de CDC y ADCC, son los resultados de inmunoglobulinas de clase G (IgG) que forman un complejo entre el dominio Fab de la IgG y un antígeno diana, mientras que el dominio Fc de la IgG se une a los receptores de Fc en las células efectoras. Algunas funciones efectoras de la IgG son independientes de la unión al antígeno e incorporan funciones tales como los niveles séricos en circulación y la capacidad de transferir Ig a través de las barreras. Otras funciones efectoras se consideran esenciales para su uso en terapias con inmunoglobulina, tales como los tratamientos contra el cáncer. El mecanismo de ADCC en particular se considera uno de los principales mecanismos antitumorales de los anticuerpos terapéuticos que ya se encuentran en el mercado, tales como rastuzumab (cáncer de mama metastásico) y rituximab (linfoma no Hodgkin).

50

55

Las estrategias terapéuticas actuales normalmente sugieren que unas funciones efectoras reducidas (o la unión reducida al receptor de Fc gamma) puede ser útil para los anticuerpos cuyo objetivo es neutralizar o inhibir la actividad biológica de un antígeno (por ejemplo, anticuerpos bloqueantes o antagonistas), o para activar o iniciar la señalización celular aguas abajo (por ejemplo, agonistas de anticuerpos). Sin embargo, el diseño de anticuerpos dirigidos a tumores con función efectora reducida es contradictorio para una terapia tumoral, ya que se espera que la citotoxicidad reducida para células diana no sea eficaz para tratar la enfermedad, es decir, destruir células tumorales o inhibir el crecimiento tumoral.

60

65

Una estrategia, descrita en el presente documento, utiliza la unión diferencial al receptor de Fc combinada con una unión biespecífica a antígenos, para dirigirse específicamente a marcadores tumorales, así como desencadenar la

destrucción de linfocitos T específicos para el tumor. El dominio Fc del anticuerpo está diseñado para controlar cuidadosamente la unión al receptor de Fc, para eliminar o reducir la destrucción no deseada de células como linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales y macrófagos que portan receptores de Fc. No se ha descrito en la técnica para una terapia de Ig dirigida a tumores un patrón de unión exclusivo con respecto a la interacción con el receptor de Fc, que comprenda interacciones de unión al receptor FcγRII, pero sin interacciones con FcγRI o FcγRIII.

Por lo tanto, la combinación de anticuerpos biespecíficos que se dirigen a linfocitos B y linfocitos T, con una unión reducida a receptores de Fc, da como resultado propiedades terapéuticas inesperadamente beneficiosas. Los anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 y CD20 son especialmente útiles en contextos clínicos en los que se desea un direccionamiento específico a CD20, pero una citotoxicidad controlada y eficaz.

Stanglmaier *et al.*, International Journal of Cancer, vol. 123, N.º 5, 1 de septiembre de 2008, páginas 1181-1189, describen un anticuerpo biespecífico para CD20 y CD3, producido a partir de una línea celular resultante de la fusión de una línea celular de ratón con una línea celular de rata, y que se informa que media la destrucción de células de linfoma de linfocitos B. El documento WO 2014/012085 describe heteromultímeros multiespecíficos que comprenden un dominio de unión a CD3 y que también pueden comprender un dominio de unión a CD20. El documento WO 2014/022540 describe proteínas de unión a antígeno que incluyen una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración EU), y un dominio CH3 que comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 341 a 447 (numeración de EU). El documento WO 2014/121087 describe anticuerpos que comprenden dominios constantes quiméricos y determinados métodos de fabricación de anticuerpos que comprenden una región bisagra quimérica.

**Breve resumen de la invención**

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos biespecíficos con dominios de unión a Fc modificados que se unen a CD3 y CD20 humanos. Los anticuerpos de acuerdo con este aspecto de la divulgación son útiles, entre otros, para dirigirse a linfocitos T que expresan CD3 y para estimular la activación de linfocitos T, por ejemplo, en circunstancias en que la destrucción mediada por linfocitos T es beneficiosa o conveniente como parte de un anticuerpo biespecífico que dirige la activación de linfocitos T mediada por CD3 a tipos celulares específicos, tales como anti-células tumorales con CD20. Los anticuerpos están además diseñados técnicamente para tener funciones efectoras específicas que no se encuentran en el repertorio natural del sistema inmunitario.

Los anticuerpos biespecíficos proporcionados para su uso en la presente invención son como se expone en las reivindicaciones. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento o la mejora de un cáncer de linfocitos B en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde el dominio Fc quimérico comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de la bisagra superior de IgG 1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración de EU);
- (b) una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana que comprende PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) de las posiciones 228 a 236 (numeración de EU);
- (c) un dominio CH1 de IgG1 humana y un dominio CH3 de IgG1 humana, o un dominio CH1 de IgG4 humana y un dominio CH3 de IgG4 humana; y
- (a) una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración de EU);

en donde el anticuerpo biespecífico presenta una mayor afinidad de unión por FcγRIIA humano con respecto a FcγRIIB humano, y presenta poca o ninguna afinidad de unión detectable por FcγRI humano y FcγRIII humano, medido en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

Los anticuerpos anti-CD3/CD20 ejemplares para su uso en la presente invención se enumeran en las Tablas 1 a 8 en el presente documento. La Tabla 1 expone los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada (las HCVR) y las regiones variables de la cadena ligera (la LCVR), así como las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3), y las regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los anticuerpos biespecíficos ejemplares. La Tabla 2 expone los identificadores de secuencia de las moléculas de ácido nucleico que codifican los HCVR, los LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos biespecíficos ejemplares. La Tabla 3 expone las combinaciones de identificadores de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos biespecíficos ejemplares que incluyen combinaciones de HCVR, región constante de cadena pesada (CH) y LCVR. La Tabla 4 expone los identificadores de secuencia de aminoácidos, las combinaciones de moléculas de ácido nucleico que codifican las combinaciones de HCVR, región constante de cadena pesada (CH) y LCVR de los anticuerpos biespecíficos ejemplares.

La Tabla 5 describe los identificadores de secuencia de aminoácidos para los ejemplos de cadena pesada de la

invención, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un HCVR que comprende un HCDR1, un HCDR2 y un HCDR3 de la Tabla 5 emparejados con un CH de la invención. La Tabla 6 describe por separado los identificadores de secuencia de aminoácidos para los ejemplos de cadena ligera de la invención, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un LCVR que comprende una LCDR1, un LCDR2 y un LCDR3 de la Tabla 6.

5 Los anticuerpos para uso en la invención pueden comprender un HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

10 Los anticuerpos para uso en la invención pueden comprender un LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos de LCVR enumerada en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

15 Los anticuerpos para uso en la invención pueden comprender una pareja de secuencias de aminoácidos de una HCVR y una LCVR (HCVR/LCVR) que comprende una pareja de secuencias de aminoácidos contenidas dentro de los anticuerpos anti-CD3/CD20 ejemplares enumerados en la Tabla 1. En determinadas realizaciones, la pareja de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/18 y 10/18 (por ejemplo, el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 2).

20 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

25 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

30 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

35 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

40 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

45 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

50 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una pareja de secuencias de aminoácidos de una HCDR3 y una LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1, tal como la pareja de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8/16 (por ejemplo, el Anticuerpo 1 o el Anticuerpo 2).

55 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas en la Tabla 1. En determinadas realizaciones, el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 son las SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 o 12-14-16-20-22-24 (por ejemplo, el Anticuerpo 1 o el Anticuerpo 2).

60 En una realización relacionada, los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenido dentro de una pareja de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR como definen los anticuerpos ejemplares enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-

LCDR3 contenido dentro de una pareja de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2/18 (por ejemplo, el Anticuerpo 1 o el Anticuerpo 2). Los métodos y técnicas para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácido de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y pueden usarse para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR específicas divulgadas en el presente documento. Las convenciones ejemplares que pueden usarse para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales y la definición de AbM es un compendio entre los enfoques de Kabat y de Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); y Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Además, están disponibles bases de datos públicas para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o porciones de los mismos, por ejemplo, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de HCVR o LCVR enumeradas en la Tabla 1; la molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de polinucleótido seleccionada de las secuencias de ácido nucleico de HCVR/LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

La presente divulgación proporciona también moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de HCDR1 o HCDR2 o HCDR3 enumeradas en la Tabla 1; la molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de polinucleótido seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR1 o HCDR2 o HCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a las mismas que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

La presente divulgación proporciona también moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCDR1 o LCDR2 o LCDR3 enumeradas en la Tabla 1; la molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de polinucleótido seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR1 o LCDR2 o LCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a las mismas que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un HCVR, en donde el HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3 es como definen los anticuerpos anti-CD3 ejemplares enumerados en la Tabla 1.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de LCDR1-LCDR2-LCDR3 es como definen los anticuerpos anti-CD3 ejemplares enumerados en la Tabla 1.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una HCVR como una LCVR, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, y en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de polinucleótido seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia de polinucleótido seleccionada de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma. La molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y una LCVR, en donde la HCVR y la LCVR proceden del mismo anticuerpo anti-CD3 enumerado en la Tabla 1.

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de CH enumeradas en la Tabla 2 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender una región constante de cadena pesada (CH) codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las secuencias de ácidos nucleicos de CH enumeradas en la Tabla 2 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona vectores de expresión recombinante capaces de expresar un polipéptido

que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 y una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD20. Por ejemplo, la presente divulgación incluye vectores de expresión recombinante que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR y/o CDR, y/o secuencias de CH como se expone en la Tabla 1 y la Tabla 2. Además, se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación las células hospedadoras en las que se han introducido tales vectores, así como los métodos de producción de los anticuerpos o porciones de los mismos mediante el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que permitan la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y la recuperación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así producidos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humano recombinante o fragmento del mismo que se une específicamente a CD3 y CD20, en donde el anticuerpo comprende un dominio Fc quimérico y un transportador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la divulgación presenta una composición que es una combinación de un anticuerpo anti-CD3/CD20 y un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede ser cualquier agente que se combine ventajosamente con un anticuerpo anti-CD3/CD20. Los agentes ejemplares que se pueden combinar ventajosamente con un anticuerpo anti-CD3/CD20 incluyen, sin limitación, otros agentes que se unen a y/o activan la señalización de CD3 (incluidos otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, etc.) y/o agentes que no se unen directamente a CD3 pero que, no obstante, activan o estimulan la activación de células inmunitarias, o potencian la destrucción tumoral. En otra parte del presente documento se describen terapias de combinación adicionales y co-formulaciones que implican los anticuerpos anti-CD3 descritos en el presente documento.

De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a CD3 y a un antígeno diana, en donde la molécula comprende un dominio Fc quimérico que tiene una función efectora reducida. La molécula puede comprender un dominio Fc quimérico como se describe en el presente documento. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden unirse a CD3 y a CD20; tales moléculas de unión a antígeno biespecíficas también se denominan en el presente documento "moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20". La porción anti-CD20 de la molécula biespecífica anti-CD3/anti-CD20 es útil para el direccionamiento a células tumorales que expresan CD20 (por ejemplo, tumores de linfocitos B), y la porción anti-CD3 de la molécula biespecífica es útil para la activación de linfocitos T. La unión simultánea a CD20 en una célula tumoral y a CD3 en un linfocito T media la destrucción dirigida (lisis celular) de la célula tumoral que se tiene como objetivo por linfocito T activado, y facilitada por las células efectoras que se unen al dominio Fc quimérico. Por lo tanto, las moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 son útiles, entre otros, para el tratamiento de enfermedades y de trastornos relacionados o provocados por tumores que expresan CD20 (por ejemplo, linfomas y tumores de melanoma).

Las moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación proporcionan además un método para la regresión de tumores positivos para CD20. Por lo tanto, la divulgación proporciona un método para el tratamiento de un cáncer de linfocitos B en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéutica de moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación, en donde la cantidad es suficiente para reducir la carga tumoral, producir regresión tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto.

Las moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación proporcionan además un método de supresión o de regresión de melanomas positivos para CD20 (es decir, que expresan CD20). Por lo tanto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un melanoma positivo para CD20 en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéutica de moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación, en donde la cantidad es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral, reducir la carga tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para el tratamiento o la mejora del cáncer en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominio de unión a antígeno, y el tratamiento o la mejora del cáncer comprende: (a) suprimir el crecimiento tumoral en el sujeto, (b) median la lisis de linfocitos B en el sujeto, (c) tratar un cáncer de linfocitos B en el sujeto, (d) tratar el cáncer que es positivo para la expresión de CD20 en el sujeto, o (e) tratar el cáncer de melanoma que expresa CD20 en el sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para suprimir el crecimiento tumoral en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno. En algunos casos, la supresión del crecimiento tumoral comprende, (a) inhibir el crecimiento de tumores en el sujeto, (b) disminuir el tamaño del tumor (o tumores) en el sujeto, o (c) disminuir el número de tumores en el sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para mediar la lisis de linfocitos B en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno. En algunos casos, los linfocitos

B son prelinfocitos B, linfocitos B maduros o células de linfoma no Hodgkin de linfocitos B.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para el tratamiento de un cáncer de linfocitos B en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno. En algunos casos, el cáncer de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en: linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma linfoblástico de linfocitos B, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, tricoleucemia y linfoma de Burkitt. En algunos casos, el sujeto padece un tumor que es resistente o que no es completamente reactivo a (a) una terapia monoespecífica anti-CD20 sola, o (b) una monoterapia con rituximab. En algunos casos, el sujeto ha recibido una terapia con anticuerpo monoespecífico anti-CD20 al menos 1 día a 1 año antes de la administración del anticuerpo biespecífico. En algunos casos, la terapia monoespecífica anti-CD20 comprende o consiste en un anticuerpo monoespecífico anti-CD20. En algunos casos, el anticuerpo monoespecífico anti-CD20 es rituximab.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para el tratamiento de un cáncer de linfocitos B en un sujeto, que comprende: (a) seleccionar un sujeto que padece cáncer que es resistente o que no es completamente reactivo a la terapia monoespecífica anti-CD20 sola; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéutica de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno. En la invención, el anticuerpo biespecífico se usa en el tratamiento o la mejora de un cáncer de linfocitos B en un sujeto. El anticuerpo biespecífico proporcionado para su uso en la invención es como se expone en las reivindicaciones.

En algunos casos, el sujeto se selecciona basándose en que tiene un tumor que es resistente, insensible o que no es completamente reactivo a la terapia monoespecífica anti-CD20. En algunos casos, la terapia monoespecífica anti-CD20 comprende o consiste en un anticuerpo monoespecífico anti-CD20. En algunos casos, el anticuerpo monoespecífico anti-CD20 es rituximab. En algunos casos, el cáncer de linfocitos B es linfoma. En algunos casos, el linfoma es linfoma no Hodgkin (LNH). En algunos casos, el cáncer de linfocitos B es la leucemia linfocítica crónica (LLC).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para el tratamiento de un cáncer de linfocitos B en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, y en donde el anticuerpo biespecífico se administra en una cantidad suficiente para reducir la carga tumoral, producir regresión tumoral, inhibir el crecimiento tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto.

En algunos casos, el cáncer de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en: linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma linfoblástico de linfocitos B, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, tricoleucemia y linfoma de Burkitt. En algunos casos, el sujeto padece un tumor que es resistente o que no es completamente reactivo a una terapia monoespecífica anti-CD20 sola. En algunos casos, el sujeto padece un tumor que es resistente o que no es completamente reactivo a una monoterapia con rituximab. En algunos casos, el sujeto ha recibido una terapia con anticuerpo monoespecífico anti-CD20 al menos 1 día a 1 año antes de la administración del anticuerpo biespecífico. En algunos casos, la terapia monoespecífica anti-CD20 comprende o consiste en un anticuerpo monoespecífico anti-CD20. En algunos casos, el anticuerpo monoespecífico anti-CD20 es rituximab. En algunos casos, la cantidad es suficiente para reducir la carga tumoral, producir regresión tumoral, inhibir el crecimiento tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto está entre aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. En algunos casos, la cantidad es suficiente para reducir la carga tumoral, producir regresión tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto, es de 0,4 mg/kg.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para el tratamiento del cáncer que es positivo para la expresión de CD20 en un sujeto, que comprende: (a) seleccionar un sujeto que padece un cáncer y/o tumores; (b) recoger una o más muestras biológicas del sujeto; (c) identificar células tumorales o cancerosas que expresan CD20 en una o más muestras; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéutica de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno.

En algunos casos, el sujeto se selecciona basándose en que tiene cáncer o un tumor que es resistente, insensible o que no es completamente reactivo a la terapia anti-CD20. En algunos casos, el sujeto se selecciona basándose en que tiene un cáncer residual. En algunos casos, la terapia anti-CD20 comprende o consiste en un anticuerpo monoespecífico anti-CD20. En algunos casos, el anticuerpo monoespecífico anti-CD20 es rituximab. En algunos casos, el cáncer es linfoma o leucemia. En algunos casos, el linfoma se selecciona del grupo que consiste en linfoma folicular, linfoma linfoblástico de linfocitos B, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de linfocitos B

grandes, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, tricoleucemia y linfoma de Burkitt. En algunos casos, la leucemia es leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para el tratamiento de un cáncer de melanoma que expresa CD20 en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéutica de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde la cantidad es suficiente para reducir la carga tumoral, inhibir el crecimiento tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20, y un dominio Fc quimérico. La presente divulgación incluye moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) en donde cada dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) emparejada con una región variable de la cadena ligera (LCVR). El dominio de unión a antígeno de anti-CD3 y el dominio de unión a antígeno de anti-CD20 pueden comprender cada uno distintos HCVR emparejados con un LCVR común. Por ejemplo, como se ilustra en el Ejemplo 2 en el presente documento, se construyeron anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende una pareja de HCVR/LCVR procedente de un anticuerpo anti-CD3; y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR procedente de un anticuerpo anti-CD20 emparejada con una LCVR procedente de un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, el mismo LCVR que está incluido en el dominio de unión a antígeno de anti-CD3). En otras palabras, en las moléculas ejemplares divulgadas en el presente documento, el emparejamiento de una HCVR de un anticuerpo anti-CD20 con una LCVR de un anticuerpo anti-CD3 crea un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 (pero no se une a CD3). En tales casos, los primero y segundo dominios de unión a antígeno comprenden distintas HCVR anti-CD3 y anti-CD20, pero comparten una LCVR de anti-CD3 común.

La presente divulgación proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR como se expone en la Tabla 1 o la Tabla 2. El primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 puede comprender también cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR como se expone en la Tabla 1 o la Tabla 2. El primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 puede comprender cualquiera de las parejas de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR como se exponen en la Tabla 1 o la Tabla 2. La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CDR1-CDR2-CDR3 de cadena pesada como se expone en la Tabla 1 o la Tabla 2, y/o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CDR1-CDR2-CDR3 de la cadena ligera como se exponen en la Tabla 1 o la Tabla 2.

De acuerdo con determinados casos, la presente divulgación proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 18, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende una pareja de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10/18.

La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un dominio CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 16, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 24, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

En determinados casos, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende una pareja de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que comprende las SEQ ID NO: 16/24.

La presente divulgación también proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un dominio CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 14, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

Determinadas moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 ejemplares no limitantes de la divulgación incluyen un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 que comprende dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24.

La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 18 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia. La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 75 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una pareja de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprenden la SEQ ID NO: 2/18 o la SEQ ID NO: 2/75.

La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende un dominio CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 24, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

En determinados casos, el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una pareja de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 8/24.

La presente divulgación también proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende un dominio CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tenga al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia.

Determinadas moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 ejemplares no limitantes de la divulgación incluyen un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 que comprende dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 (por ejemplo, el Anticuerpo 1

o el Anticuerpo 2).

En un caso, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación incluyen un primer dominio de unión a antígeno (A1) que se une específicamente a CD3 humano y comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (A1-HCDR1, A1-HCDR2, A1-HCDR3) y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (A1-LCDR1, A1-LCDR2, A1-LCDR3), y un segundo dominio de unión a antígeno (A2) que se une específicamente a CD20 humano y comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3) y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (A2-LCDR1, A2-LCDR2 y A2-LCDR3); en donde: (a) A1-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (b) A1-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (c) A1-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; (d) A1-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; (e) A1-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; (f) A1-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; (g) A2-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; (h) A2-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (i) A2-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; (j) A2-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; (k) A2-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y (l) A2-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

En un caso relacionado, la divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende los dominios CDR de cadena pesada y ligera contenidos dentro de las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la ligera (HCVR/LCVR) de las SEQ ID NO: 2/18.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR o CDR de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 divulgadas en el presente documento, incluyendo moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de polinucleótido como se exponen en las Tablas 2, 7 y 8 en el presente documento, así como moléculas de ácido nucleico que comprenden dos de las secuencias de polinucleótido como se exponen en las Tablas 2, 7 y 8 en cualquier combinación funcional o disposición de las mismas. Los vectores de expresión recombinante que portan los ácidos nucleicos de la divulgación, y las células hospedadoras en las que se han introducido dichos vectores, también están abarcados por la divulgación, como lo están los métodos de producción de anticuerpos mediante el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos y la recuperación de los anticuerpos producidos.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 en donde cualquiera de los dominios de unión a antígeno mencionados anteriormente que se unen específicamente a CD3 se combina, conectan o asocian de otra manera con cualquiera de los dominios de unión a antígeno mencionados anteriormente que se unen específicamente a CD20 para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une a CD3 y CD20.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno. En un aspecto relacionado, el anticuerpo biespecífico tiene la capacidad de unirse específicamente al FcγRIIA humano y al FcγRIIB humano. La presente divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 que se unen preferentemente a FcγRIIA humano y FcγRIIB humano y presentan poca o ninguna afinidad de unión a FcγRI humano o FcγRIII humano. En un aspecto, los anticuerpos biespecíficos son capaces de unirse específicamente a FcγRIIA humano con una afinidad más alta que para la unión a FcγRIIB humano, FcγRI humano y/o FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos de la divulgación son capaces de unirse específicamente a FcγRIIA humano y a FcγRIIB humano a afinidades más altas que los anticuerpos que se unen a FcγRI humano o a FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, en donde el anticuerpo se une específicamente tanto a FcγRIIA humano como a FcγRIIB humano, y presenta una afinidad de unión con una  $K_D$  de menos de 1  $\mu$ M para cada uno de FcγRI humano y FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*. En la invención, el anticuerpo biespecífico presenta una mayor afinidad de unión por FcγRIIA humano con respecto a FcγRIIB humano, y presenta poca o ninguna afinidad de unión detectable por FcγRI humano y FcγRIII humano, medido en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En otros aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer y segundo polipéptido de cadena pesada, comprendiendo cada uno un dominio Fc quimérico, en donde el primer polipéptido de cadena pesada comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, y en donde el segundo polipéptido de cadena pesada comprende un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano.

En otros casos, el anticuerpo presenta una afinidad de unión más alta, es decir, más fuerte, por FcγRIIA humano con respecto a su unión al FcγRIIB humano, medido en un ensayo *in vitro*. En aún otros casos, el anticuerpo se une al FcγRIIA humano y presenta un valor de  $K_D$  más bajo con respecto a su unión al FcγRIIB humano, medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, el anticuerpo se une al FcγRIIA humano a 25 °C con un valor de  $K_D$  de entre 10 y 30  $\mu$ M,

medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, el anticuerpo se une al FcγRIIB humano a 25 °C con un valor de  $K_D$  de entre 100 y 250 μM, medido en un ensayo *in vitro*.

5 En otro caso, el anticuerpo presenta poca afinidad de unión, o no detectable, para el FcγRI humano, medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, el anticuerpo presenta poca afinidad de unión, o no detectable, para el FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*.

En algunos casos, el ensayo *in vitro* es en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

10 En algunos casos, el anticuerpo presenta citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

15 En algunos casos, el anticuerpo presenta citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) insignificante o no detectable.

20 En algunos casos, el anticuerpo presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) disminuida en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

En algunos casos, el anticuerpo presenta menos del 50 % de citotoxicidad, determinado por medición de la lisis celular en un ensayo *in vitro*.

25 En algunos casos, el anticuerpo presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) insignificante o no detectable.

30 En algunos casos, el anticuerpo induce la disminución de la destrucción mediada por linfocitos T de células que portan receptores Fc, tales como linfocitos NK o macrófagos, en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

En determinados casos, el anticuerpo induce la disminución de la muerte de linfocitos T, mediado por células portadoras de receptor Fc tales como los linfocitos NK o los macrófagos, en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

35 En algunos casos, el anticuerpo presenta una afinidad de unión a FcγRIIA humano más fuerte que su afinidad de unión a FcγRIIB humano, que es más fuerte que su afinidad de unión a FcγRI humano, que es más fuerte que o equivalente a su afinidad de unión a FcγRIII humano, determinado por la medición de la  $K_D$  en un ensayo *in vitro*. En otros casos, el anticuerpo presenta una afinidad de unión a FcγRIIA humano > FcγRIIB humano > FcγRI humano >= FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*.

40 En algunos casos, el anticuerpo presenta una afinidad de unión a FcγRIIA humano más fuerte que su afinidad de unión a FcγRIIB humano, que es más fuerte que su afinidad de unión a FcγRIII humano que es más fuerte o equivalente a su afinidad de unión a FcγRI humano, determinado por la medición de la  $K_D$  en un ensayo *in vitro*. En otros casos, el anticuerpo presenta una afinidad de unión a FcγRIIA humano > FcγRIIB humano > FcγRIII humano >= FcγRI humano, medido en un ensayo *in vitro*.

45 En algunos casos, el FcγRIII humano es FcγRIIIA humano o FcγRII IB humano.

50 En algunos casos, el dominio Fc quimérico comprende una bisagra quimérica.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno, un segundo dominio de unión a antígeno y una región constante de cadena pesada (CH) quimérica, en donde (a) el primer dominio de unión a antígeno se une a CD3, (b) el segundo dominio de unión a antígeno se une a CD20. En determinados aspectos, la región CH quimérica se une con una mayor, es decir, más fuerte, afinidad a FcγRIIA humano y FcγRIIB humano, en comparación con un anticuerpo que comprende una región CH de tipo silvestre, medido en un ensayo *in vitro*. En otro aspecto más, el CH quimérico se une con una menor, es decir, más débil, o ninguna, afinidad a FcγRI humano y FcγRIII humano, en comparación con un anticuerpo que comprende una región CH de tipo silvestre, medido en un ensayo *in vitro*.

60 La divulgación proporciona anticuerpos biespecíficos que comprenden una región bisagra quimérica. En algunos aspectos, la región bisagra quimérica comprende restos de secuencia de aminoácidos de las posiciones 216 a 236 (numeración de EU). Se construyen anticuerpos biespecíficos de la divulgación en donde la bisagra quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) de las posiciones 228 a 236 (numeración de EU). En determinados casos, los anticuerpos biespecíficos de la divulgación comprenden una bisagra quimérica y la porción de bisagra superior de la bisagra quimérica comprende los restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) de una bisagra superior de IgG1. En otros casos, los

anticuerpos biespecíficos de la divulgación comprenden una bisagra quimérica y la porción de bisagra superior de la bisagra quimérica comprende los restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) de una bisagra superior de IgG4.

5 En un caso, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 53). En otro caso, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 54). En determinados casos, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración de EU). En otros casos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio CH3 procedente de un dominio CH3 de IgG 1 humana o un dominio CH3 de IgG4 humana. En aún otros casos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio CH1 de IgG 1 humana y un dominio CH3 de IgG 1 humana. En más casos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio CH1 de IgG4 humana y un dominio CH3 de IgG4 humana.

15 En los anticuerpos biespecíficos de la invención, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde el dominio Fc quimérico comprende: (a) una secuencia de aminoácidos de la bisagra superior de IgG 1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración de EU); (b) una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana que comprende PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) de las posiciones 228 a 236 (numeración de EU); (c) un dominio CH1 de IgG1 humana y un dominio CH3 de IgG1 humana, o un dominio CH1 de IgG4 humana y un dominio CH3 de IgG4 humana; y (d) una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración de EU).

25 Un aspecto de la divulgación proporciona un método de fabricación de un anticuerpo biespecífico que comprende una región quimérica de cadena pesada constante, comprendiendo dicho método: (a) transfectar una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena ligera capaz de unirse al antígeno CD3, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de la primera y una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante CL de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están operativamente unidas entre sí; (b) transfectar la célula hospedadora de la etapa (a) con una molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada del anticuerpo capaz de unirse al antígeno CD3, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH y una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante CH quimérica de una Ig humana, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH y la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están operativamente unidas entre sí; en donde la región CH codifica una o más modificaciones de aminoácidos en el dominio CH3 que reducen o eliminan la unión del segundo dominio CH3 a la Proteína A; (c) transfectar la célula hospedadora de la etapa (a) con una molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada del anticuerpo capaz de unirse al antígeno CD20, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH quimérica de una Ig humana, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH y la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están operativamente unidas entre sí; y (c) fabricar dicho anticuerpo coexpresando las moléculas de ácido nucleico de (a) y (b) en dicha célula hospedadora.

45 En un caso, la presente divulgación proporciona un método de fabricación de un anticuerpo biespecífico mediante: (a) transfección de una célula hospedadora con (i) una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la LCVR que comprende la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante C<sub>L</sub> de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la LCVR del anticuerpo está operativamente unida a la secuencia de nucleótidos que codifica la región C<sub>L</sub> de una Ig; (b) transfección de la célula hospedadora de la etapa (a) con (i) una molécula de ácido nucleico que codifica la primera cadena pesada de dicho anticuerpo, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la HCVR que comprende la SEQ ID NO: 10, y una secuencia de nucleótidos que codifica una región C<sub>H</sub> quimérica de una Ig, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región C<sub>H</sub> comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 32, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la HCVR está operativamente unida a la secuencia de nucleótidos que codifica la región C<sub>H</sub>; y (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica la segunda cadena pesada de dicho anticuerpo, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la HCVR que comprende la SEQ ID NO: 2, y una secuencia de nucleótidos que codifica una región C<sub>H</sub> quimérica de una Ig, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región C<sub>H</sub> comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 32, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la HCVR está operativamente unida a la secuencia de nucleótidos que codifica la región C<sub>H</sub>; y (c) fabricación del anticuerpo coexpresando las moléculas de ácido nucleico de (a) y (b) en dicha célula hospedadora. En algunos casos, el método comprende adicionalmente las etapas de cultivar la célula hospedadora de la etapa (b), en la que el anticuerpo se secreta en un medio de cultivo celular; y aislar el anticuerpo de los medios de cultivo celular.

65 En algunos aspectos, el método de fabricación del anticuerpo biespecífico comprende opcionalmente transfectar la célula hospedadora de la etapa (a) con una molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena ligera capaz

de unirse al antígeno CD20, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de la segunda cadena ligera y una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante CL de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de la segunda cadena ligera y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están operativamente unidas entre sí.

5 En algunos casos, la primera cadena pesada comprende una región CH3 que comprende una modificación H95R (por la numeración de exones de IMGT; H435R por la numeración de EU). En otro caso, la primera cadena pesada comprende una región CH3 que comprende adicionalmente una modificación Y96F (IMGT; Y436F por la numeración de EU). En más casos, el método comprende aislar el anticuerpo usando Proteína A.

10 Otro aspecto de la divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende: (a) una primera cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un primer antígeno diana, (b) una segunda cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un segundo antígeno diana, y (c) un dominio de unión a antígeno de cadena ligera común capaz de reconocer y unirse al primer o  
15 segundo antígeno diana, en donde la cadena pesada de (a) o (b), o ambas, (a) y (b), comprenden la región constante de la cadena pesada (CH) que comprende una región bisagra quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 o la SEQ ID NO: 54.

20 En determinados casos, la región constante de la cadena pesada (CH) comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 32. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica la CH quimérica comprende la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 33. En otros casos, la secuencia de nucleótidos de la CH quimérica codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 32. En aún otros casos, la secuencia de nucleótidos de la región CH comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencias de  
25 aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 33.

En determinados aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. En otros aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera que comprende la secuencia de  
30 nucleótidos de la SEQ ID NO: 34.

En determinados aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En otros aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada que comprende la secuencia  
35 de nucleótidos de la SEQ ID NO: 36.

En determinados aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. En otros aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada que comprende la secuencia  
40 de nucleótidos de la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 39.

En determinados aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. En otros aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada que comprende la secuencia  
45 de nucleótidos de la SEQ ID NO: 41.

En determinados aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44. En otros aspectos, el anticuerpo biespecífico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada que comprende la secuencia  
50 de nucleótidos de la SEQ ID NO: 43.

Se puede proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 como se divulga en el presente documento. En un aspecto relacionado, se puede proporcionar una  
55 composición que sea una combinación de una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 y un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede ser cualquier agente que se combine ventajosamente con una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20. Los agentes ejemplares que se pueden combinar ventajosamente con una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 se analizan con detalle en otra parte del presente documento.

60 En otro aspecto más, la divulgación proporciona métodos terapéuticos para el direccionamiento a/destrucción de células tumorales que expresan CD20 usando una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 descrita en el presente documento, en donde los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunos casos, la molécula de unión  
65 a antígeno biespecífica (por ejemplo, un anticuerpo) se une a células humanas que expresan CD20 o se une a linfocitos B humanos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos biespecíficos en los que el anticuerpo: se une a células humanas que expresan CD3 humano y a células de mono cinomolgo que expresan CD3 de cinomolgo; se une a linfocitos T humanos o linfocitos T de cinomolgo; se une a linfocitos T humanos que expresan CD3 con un valor de  $CE_{50}$  de entre  $1 \times 10^{-12}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M; se une a linfocitos T humanos que expresan CD3 con un valor de  $CE_{50}$  de entre  $1 \times 10^{-9}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M; se une a linfocitos B humanos que expresan CD20 con un valor de  $CE_{50}$  de entre  $1 \times 10^{-12}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M; se une a linfocitos B humanos que expresan CD20 con un valor de  $CE_{50}$  de entre  $1 \times 10^{-9}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M; o potencia la citotoxicidad mediada por linfocitos T de los linfocitos B humanos que son resistentes o insensibles a la citotoxicidad mediada por anti-CD20.

En diversos métodos o usos de la presente divulgación, una única administración del anticuerpo biespecífico a un sujeto a una dosis de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg provoca en el sujeto una reducción del número de linfocitos B por debajo de niveles detectables aproximadamente el día 2 después de la administración del anticuerpo biespecífico al sujeto. En algunos casos, el número de linfocitos B permanece por debajo de niveles detectables hasta al menos aproximadamente 7 días después de la administración de una dosis única de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg del anticuerpo biespecífico al sujeto.

La presente divulgación incluye el uso de una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación para el direccionamiento a/destrucción de células tumorales que expresan CD20, y en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con o provocado por la expresión de CD20. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico de la presente divulgación se usa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la mejora del cáncer en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, y el tratamiento o la mejora del cáncer comprende: (a) suprimir el crecimiento tumoral en el sujeto, (b) median la lisis de linfocitos B en el sujeto, (c) tratar un cáncer de linfocitos B en el sujeto, (d) tratar el cáncer que es positivo para la expresión de CD20 en el sujeto, o (e) tratar el cáncer de melanoma que expresa CD20 en el sujeto.

La presente divulgación también incluye un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno, un segundo dominio de unión a antígeno y una región constante de cadena pesada (CH) quimérica, en donde: el primer dominio de unión a antígeno se une a CD3, el segundo dominio de unión a antígeno se une a CD20, la región CH quimérica se une con una mayor, es decir, más fuerte, afinidad por Fc $\gamma$ RIIA humano y Fc $\gamma$ RIIB humano, en comparación con un anticuerpo que comprende una región CH de tipo silvestre, tal anticuerpo biespecífico para uso en la fabricación de un medicamento. La divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20, y una región CH quimérica que se une con mayor, es decir, más fuerte, afinidad a Fc $\gamma$ RIIA humano que con la que se une a Fc $\gamma$ RIIB humano, para su uso en la fabricación de un medicamento.

Otras realizaciones serán evidentes tras la revisión de la siguiente descripción detallada.

#### Breve descripción de las figuras

LA **Figura 1** ilustra los aminoácidos de la bisagra utilizados en la construcción de regiones bisagra quiméricas y las convenciones de numeración de aminoácidos correspondientes.

La **Figura 2** representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana, que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 como se describe como IGHG1 en el N.º de Ref. de UniProtKB/SwissProt P01857 (SEQ ID NO: 45).

La **Figura 3** representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG2 humana, que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 como se describe como IGHG2 en el N.º de Ref. de UniProtKB/SwissProt P01859 (SEQ ID NO: 46).

La **Figura 4** representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 como se describe como IGHG4 en el N.º de Ref. de UniProtKB/SwissProt P01861 (SEQ ID NO: 47).

**Figuras 5A y 5B:** Curvas de respuesta a la dosis que representan la falta de actividad CDC con respecto a las células Daudi (FIG. 5A) y Raji (FIG. 5B) en presencia de anticuerpos que tienen regiones de  $C_H$  de bisagra quiméricas o de tipo silvestre. (Anticuerpo 4 "de control" = Ac biespecífico con  $C_H$  de IgG 1 de ts; Anticuerpo 1; Anticuerpo 2; Control de isotipo de IgG1 = Ac inespecífico con  $C_H$  de IgG1 de ts.)

**Figuras 6A y 6B:** Curvas de respuesta a la dosis que representan la falta de actividad ADCC con respecto a las células Daudi (FIG. 6A) y Raji (FIG. 6B) en presencia de anticuerpos que tienen regiones de  $C_H$  de bisagra quiméricas o de tipo silvestre. (Anticuerpo 4 "de control" = Ac biespecífico con  $C_H$  de IgG 1 de ts; Anticuerpo 1; Anticuerpo 2; Control de isotipo de IgG1 = Ac inespecífico con  $C_H$  de IgG1 de ts.)

Las **Figuras 7A-7F** muestran el volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>) a lo largo del tiempo en ratones NSG implantados por vía subcutánea con una mezcla de células tumorales Raji y CMSP (o sin control de CMSP - Fig. 7D) y se administró un anticuerpo biespecífico CD3xCD20 de la invención (Ac1) o vehículo, o anticuerpo de control, después de la implantación del tumor y el tratamiento, comenzando el mismo día de la implantación del tumor (día 0), y medido a lo largo de la duración del estudio. Fig. 7A: Ningún ratón mostró inhibición del crecimiento tumoral con el

tratamiento con vehículo; Fig. 7B: 1 de 5 (1/5) ratones mostró inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con Ac5 de control (Ac anti-FeID1) 0,4 mg/kg; Fig. 7C: 5/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con Anticuerpo 1 (Ac1) 0,4 mg/kg; Fig. 7D: 0/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral cuando no se implantaron CMSP y con tratamiento con Ac1 0,4 mg/kg; Fig. 7E: 5/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con Ac1 0,04 mg/kg; y Fig. 7F: 5/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con Ac1 0,004 mg/kg.

Las **Figuras 8A y 8B** muestran el volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>) a lo largo del tiempo en ratones NSG implantados por vía subcutánea con una mezcla de células tumorales Raji y CMSP, y tratados con Ac1 (CD3xCD20-Fc quimérico) en comparación con el vehículo, con o sin suplemento de IgG (Fig. 8A), o tratados con Ac4 (CD3xCD20-Fc) en comparación con el vehículo, con o sin suplemento de IgG (Fig. 8B). Ambos anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 demuestran una inhibición significativa del crecimiento tumoral con suplemento de IgG en este modelo. Como se observa en la Fig. 8A, en este experimento el anticuerpo biespecífico CD3xCD20-Fc quimérico (Ac1) demuestra una inhibición completa del crecimiento tumoral durante el período de tiempo analizado con o sin suplemento de IgG.

La **Figura 9** ilustra la regresión de tumores establecidos (-200-400 mm<sup>3</sup>) al 14<sup>o</sup> día en ratones NSG tratados con anticuerpo biespecífico CD3xCD20. 15 días antes del tratamiento se implantó por vía subcutánea a los ratones NSG una mezcla de células tumorales Raji y CMSP, para permitir que los tumores se establecieran. Los ratones se trataron posteriormente con Anticuerpo 1 (anticuerpo CD3xCD20-Fc quimérico) 0,4 mg/kg o con Ac5 de control 0,4 mg/kg (Ac anti-FeID1), o con control de vehículo, una vez por semana (día 7, día 14, día 21).

La **Figura 10** ilustra la regresión de tumores establecidos (-500-900 mm<sup>3</sup>) al 21<sup>er</sup> día en ratones NSG tratados con anticuerpo biespecífico CD3xCD20. 15 días antes del tratamiento se implantó por vía subcutánea a los ratones NSG una mezcla de células tumorales Raji y CMSP, para permitir que los tumores se establecieran. Los ratones se trataron con Anticuerpo 1 (anticuerpo CD3xCD20-Fc quimérico) 0,4 mg/kg o con Ac5 de control 0,4 mg/kg (Ac anti-FeID1), una vez por semana (día 7, día 14, día 21).

Las **Figuras 11A y 11B** representan la potencia *in vivo* de la administración de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 en comparación con la administración de anticuerpo monoespecífico (rituximab), midiendo los cambios de los niveles de linfocitos B CD20+ o en los niveles de linfocitos T CD3+ en sangre periférica de monos cinomolgo en un estudio de 7 días. En el día 0 se administraron anticuerpos o placebo. Fig. 11A: Los niveles de linfocitos B en sangre periférica estaban significativamente empobrecidos en el día 2 en todas las muestras, excepto las con placebo; Fig. 11B: En el día 2 se observó una pérdida transitoria de linfocitos T y se restableció a los niveles basales el día 4 en la sangre periférica de los animales tratados con anticuerpos biespecíficos. No se observó pérdida de linfocitos T (por debajo del valor basal) en los grupos de placebo o rituximab (Rituxan).

Las **Figuras 12A y 12B** representan la potencia *in vivo* de la administración de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4, midiendo los cambios de los niveles de linfocitos B CD20+ o en los niveles de linfocitos T CD3+ en sangre periférica de monos cinomolgo en un estudio a largo plazo (3 meses). Se administró placebo (vehículo) o anticuerpos biespecíficos a 1,0 mg/kg en el día 0. Fig. 12A: Los niveles de linfocitos B en sangre periférica estaban significativamente empobrecidos en el día 2 y permanecieron empobrecidos a lo largo del estudio en todas las muestras, excepto en las con placebo; Fig. 12B: El día 2 se observó una pérdida transitoria de linfocitos T, después, los linfocitos T se recuperaron a los niveles basales en el día 4 y permanecieron alrededor del valor basal, según se midió durante todo el estudio (> 80 días) para animales tratados con anticuerpos biespecíficos. No se observó pérdida transitoria de linfocitos T en los animales tratados con placebo.

Las **Figuras 13A y 13B** representan la potencia *in vivo* de la administración de una baja dosis de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4, midiendo los cambios de los niveles de linfocitos B CD20+ o en los niveles de linfocitos T CD3+ en sangre periférica de monos cinomolgo en un estudio a largo plazo (2 meses). Los anticuerpos biespecíficos se administraron a 0,01 mg/kg o 0,001 mg/kg (1 mg/kg) en el día 0. Fig. 13A: Los niveles de linfocitos B en sangre periférica estaban significativamente empobrecidos en el día 2 y permanecieron empobrecidos a lo largo del estudio, de manera similar a lo observado para los animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (véanse también las Figuras 11A o 12A); Fig. 13B: Los animales tratados con dosis muy bajas (1 mg/kg) de anticuerpos biespecíficos experimentan la misma pérdida transitoria de linfocitos T y la recuperación que se observa en animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (véase también la Figura 11B o 12B).

La **Figura 14** muestra la correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos en la sangre periférica de animales tratados con Anticuerpo 1 de CD3xCD20-Fc quimérico. A medida que la exposición de los anticuerpos (símbolos blancos) en la circulación de los animales se empobrece con el tiempo, las poblaciones de linfocitos B (símbolos negros) comienzan a recuperarse (por ejemplo, como se observa en el día 81 para el animal n.º 106881 (círculo negro)).

La **Figura 15** muestra la correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos en la sangre periférica de animales tratados con Anticuerpo 2 de CD3xCD20-Fc quimérico. A medida que la exposición de los anticuerpos (símbolos blancos) en la circulación de los animales se empobrece con el tiempo, las poblaciones de linfocitos B (símbolos negros) comienzan a recuperarse (por ejemplo, como se observa en el día 66 para el animal n.º 106876 (triángulo negro), y en el día 68 para el animal n.º 106877 (cuadrado negro)).

La **Figura 16** muestra la correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos en la sangre periférica de animales tratados con anticuerpo biespecífico CD3xCD20-Fc (Ac 4). A medida que la exposición de los anticuerpos (símbolos blancos) en la circulación de los animales se empobrece con el tiempo, las poblaciones

de linfocitos B (símbolos negros) comienzan a recuperarse (por ejemplo, como se observa en el día 91 para el animal n.º I06870 (triángulo negro), y en el día 64 para el animal n.º I06872 (círculo negro)).

Las **Figuras 17A y 17B** representan el empobrecimiento de linfocitos B tisulares en bazo (Fig. 17A) o ganglios linfáticos mesentéricos (Fig. 17B) de monos cinomolgo, como resultado de la administración de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20, en comparación con el anticuerpo mono específico anti-CD20, con dosis mucho más bajas (dosis de 0,01 a 1,0 mg/ kg) administradas a las cohortes con biespecífico. Este empobrecimiento no se observó en la cohorte de animales de control con placebo en ninguno de los tejidos. Ambos anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (Ac1 y Ac 4) provocaron un empobrecimiento de linfocitos B dependiente de la dosis en los órganos linfáticos, y a dosis equivalentes o mayores a 0,1 mg/ kg, los anticuerpos biespecíficos empobrecen linfocitos B de forma más eficaz que rituximab.

Las **Figuras 18A y 18B** ilustran que los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 inducen la proliferación de las CMSP humanas (Fig. 18A) o CMSP de cinomolgo (Fig. 18B) en un bioensayo *in vitro*, mientras que el Anticuerpo 5 de control (-▲-; no específico para CD3xCD20) no presentó actividad.

Las **Figuras 19A y 19B** ilustra la destrucción de las Raji diana mediada por CD3xCD20 en un ensayo de citotoxicidad. El Anticuerpo 1 medió la destrucción de células diana con unos valores de CE<sub>50</sub> representativos de 25,0 pM y 9,10 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. El Anticuerpo 4 medió la destrucción de células diana con unos valores de CE<sub>50</sub> representativos de 15,7 pM y 1,73 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. No se observó actividad del control (-▲-).

Las **Figuras 20A y 20B** ilustran que el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 media la destrucción celular mediante linfocitos T indiferenciados. La Figura 20A muestra un diagrama de dispersión de FACS representativo a la concentración más alta probada de Anticuerpo 4. Células B16F10.9 de tipo silvestre están marcadas con CFDA-SE y las células B16F10.9/CD20 están marcadas con Cell Tracker violeta. Las células efectoras no están marcadas. El segundo panel de la Fig. 20A muestra que las células que expresan CD20 se eliminan (cuadrante inferior derecho) mediante el tratamiento con anti-CD3xCD20. La Figura 20B muestra la proporción de células B16F10.9/ CD20 supervivientes después de 48 horas en presencia de anticuerpos CD20xCD3, es decir el Anticuerpo 4 (Fcts), el Anticuerpo 1 (Fcquimérico) o el Ac 5 de control, y de CMSP. La supervivencia porcentual se determinó comparando el porcentaje de linfocitos B16F10.9/CD20 con las células B16F10.9 negativas para CD20 en la población de células vivas. El Ac 4 y el Ac 1 dirigieron de forma específica a los linfocitos T humanos a destruir solo las células diana que expresaban CD20 (Figura 20B) en una población mixta de células. La destrucción de células diana solo se observó en presencia de los anticuerpos biespecíficos, con un empobrecimiento de las células B16F10.9/CD20 de forma dependiente de la dosis por el Anticuerpo 4 (CE<sub>50</sub> 12,8 pM) y el Anticuerpo 1 (CE<sub>50</sub> 19,5 pM) (Figura 20B). Menos del 5 % de las células que expresan CD20 estaban vivas a la dosis más alta analizada (10 µg/ml).

La **Figura 21** muestra el porcentaje de células activadas (CD69+) del total de células efectoras CD2+ en un ensayo de citotoxicidad de 48 horas que se dirigen a las células B16F10.9/CD20, inducida dicha activación por cualquiera de los anticuerpos CD20xCD3, es decir el Anticuerpo 4 (Fcts) o el Anticuerpo 1 (Fc quimérico).

Las **Figuras 22A y 22B** ilustran que el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 inducía el agrupamiento de linfocitos T con las células diana (células CD20+) a través de sus brazos de unión biespecífica. Las células efectoras están teñidas con CFSE y las células CD20+ están teñidas con Cell Tracker violeta, y están seleccionadas para separar los cuadrantes. Después de la incubación con un anticuerpo irrelevante de control (Anticuerpo 5 de control), no aparece agrupamiento (doble tinción) en la mezcla celular (Fig. 22A). Después de la incubación con el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 (Ac 4), aparecen agrupamientos de células debido a que están teñidos con CFSE y con violeta (véase el cuadrante superior izquierdo en el diagrama de dispersión de la Fig. 22B, destacado con el cuadrado en negrita).

La **Figura 23** muestra un estudio del volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>) en ratones NSG a los que se les implantó por vía subcutánea una mezcla de células tumorales Raji y de CMSP, mientras que un anticuerpo biespecífico CD3xCD20 de la invención (Ac 1) a 0,4 mg/kg, 2X/semana (i.p.), un anticuerpo irrelevante de Ac 6 de control a 0,4 mg/kg, 2X/semana (i.p.) o vehículo se comparaban con rituximab, un anticuerpo anti-CD20 a 8 mg/kg, 5X/semana (i.p.) y BiTE CD19xCD3 a 0,5 mg/kg, 5X/semana (i.v.). (Para BiTE CD19xCD3, véase Nagorsen D, *et al.* Pharmacol Ther. diciembre de 2012;136(3):334-42, 2012.) El tratamiento se administró a ratones con tumores establecidos (-100-500 mm<sup>3</sup>). Los datos se expresan como la media (ETM) y se sometieron a análisis de ANOVA. Ab1, que se dosificó 2x por semana i.p., fue comparable en potencia al BiTE CD19xCD3, que se dosificó 5x/semana i.v. en este modelo *in vivo*.

La **Figura 24** muestra el estudio del volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>) en ratones NSG a los que se les implantó por vía subcutánea una mezcla de Raji/CMSP, de forma análoga a la Figura 23, sin embargo, se proporciona un análisis de ANOVA para el Ac 1, el Ac 6 de control, rituximab y el control de vehículo. El Ac 1 dosificado 2x por semana fue superior a la terapia con rituximab (dosificado a 8 mg/kg; 5x/semana i.p.) en la supresión de tumores de Raji establecidos.

Las **Figuras 25A y 25B** ilustran el retraso del crecimiento tumoral cuando el tratamiento se inició de forma simultánea o posterior al trasplante de tumor hCD20/B16F10.9 en ratones humanizados tratados con el anticuerpo biespecífico CD3xCD20. Fig. 25A: Se les implantó a ratones hCD3 por vía subcutánea células de melanoma B16F10.9 transducidas con hCD20 y se trataron simultáneamente con Anticuerpo 1 (anticuerpo CD3xCD20-Fcquimérico) 0,004 mg/kg o 0,4 mg/kg, o Ac5 de control 4 mg/kg (Ac anti-FcD1), o control de vehículo (i.p. 2 veces por semana). Fig. 25B: Se les implantó a ratones hCD3 por vía subcutánea células de melanoma hCD20/B16F10.9 y en el día 10 y a partir de entonces se trataron los tumores establecidos con el Anticuerpo 1 (anticuerpo

CD3xCD20-Fcquimérico) o con control. Los ratones se trataron por vía i.p. dos veces por semana con 0,4 mg/kg o 4 mg/kg de Ac1, o 0,4 mg/kg de Ac5 de control (Ac anti-Fe1D1), o control de vehículo.

### Descripción detallada

5 Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales particulares descritos, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

15 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar del valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101, y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

20 Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferentes.

### Definiciones

25 La expresión "CD3" como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno que se expresa en los linfocitos T como parte del receptor multimolecular de linfocitos T (TCR) y que consiste en un homodímero o heterodímero formado a partir de la asociación de dos de las cuatro cadenas del receptor: CD3-épsilon, CD3-delta, CD3-zeta y CD3-gamma. Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas en el presente documento pretenden referirse a la versión humana de la respectiva proteína, polipéptido o fragmento de proteína, a menos que se especifique explícitamente que son de una especie no humana. Por lo tanto, la expresión CD3 significa CD3 humano a menos que se especifique que sea de una especie no humana, por ejemplo, "CD3 de ratón" "CD3 de mono" etc.

35 Como se usa en el presente documento, "un anticuerpo que se une a CD3" o un "anticuerpo anti-CD3" incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente una única subunidad de CD3 (por ejemplo, épsilon, delta, gamma o zeta), así como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente un complejo dimérico de dos subunidades de CD3 (por ejemplo, dímeros de CD3 gamma/épsilon, delta/épsilon y zeta/zeta). Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno pueden unirse a CD3 soluble y/o CD3 expresado en la superficie celular. CD3 soluble incluye proteínas CD3 naturales, así como variantes de proteína CD3 recombinantes tales como, por ejemplo, construcciones de CD3 monoméricas y dimericas, que carecen de un dominio transmembrana o no están de otro modo asociados con una membrana celular.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "CD3 expresada en la superficie celular" significa una o más proteínas CD3 que se expresan en la superficie de una célula *in vitro* o *in vivo*, de modo que al menos una porción de una proteína CD3 se expone al lado extracelular de la membrana celular y es accesible a una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. "CD3 expresada en la superficie celular" incluye proteínas CD3 contenidas dentro del contexto de un receptor de linfocito T funcional en la membrana de una célula. La expresión "CD3 expresada en la superficie celular" incluye la proteína CD3 expresada como parte de un homodímero o heterodímero en la superficie de una célula (por ejemplo, dímeros CD3 gamma/épsilon, delta/épsilon y zeta/zeta). La expresión, "CD3 expresada en la superficie celular" también incluye una cadena de CD3 (por ejemplo, CD3-épsilon, CD3-delta o CD3-gamma) que se expresa por sí sola, sin otros tipos de cadenas de CD3, sobre la superficie de una célula. Una "CD3 expresada en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína CD3 expresada en la superficie de una célula que normalmente expresa la proteína CD3. Como alternativa, "CD3 expresada en la superficie celular" puede comprender o consistir en la proteína CD3 expresada en la superficie de una célula que normalmente no expresa CD3 humana en su superficie, pero que se ha diseñado técnicamente de forma artificial para expresar CD3 en su superficie.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-CD3" incluye tanto anticuerpos monovalentes con una especificidad única, como anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer brazo que se une a CD3 y un segundo brazo que se une a un segundo antígeno (diana), en donde el brazo anti-CD3 comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se exponen en la Tabla 1 o la Tabla 2 en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos anti-CD3 se describen en otra parte del presente documento. La expresión "molécula de unión a antígeno" incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD3 también se describen en el documento US 2007/0280945A1; y en la solicitud internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre de 2013 y publicada como documento WO2014047231.

65

El término "CD20", como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína CD20 humana a menos que se especifique que es de una especie no humana (por ejemplo, "CD20 de ratón" "CD20 de mono" etc.). La proteína CD20 humana tiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia de NCBI NP\_690605.1.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-CD20" incluye anticuerpos monovalentes con una especificidad única, tal como Rituxan (rituximab), como se describe en el documento US 7.879.984. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 también se describen en el documento US 7.879.984 y la solicitud internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre de 2013 y publicada como documento WO2014047231.
- 10 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente a o interacciona con un antígeno particular (por ejemplo, CD3). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como los multímeros de las mismas (por ejemplo, IgM).
- 15 Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V<sub>L</sub>) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C<sub>L1</sub>). Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En casos diferentes, las FR del anticuerpo anti-CD3 (o porción de unión a antígeno del mismo)
- 20 pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden estar modificadas de forma natural o artificial. Una secuencia consenso de aminoácidos se puede definir basándose en un análisis paralelo de dos o más CDR.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usa en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, que pueda obtenerse enzimáticamente, sintética o técnicamente diseñada, que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden proceder, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, usando cualquier técnica convencional adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas recombinantes de ingeniería genética que implican la manipulación

30 y expresión de ADN que codifica los dominios variables y, opcionalmente, los constantes, de un anticuerpo. Dicho ADN se conoce y/o se puede adquirir fácilmente en, por ejemplo, fuentes comerciales, de bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de anticuerpos en fagos) o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv monocatenario (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo

45 (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado. Otras moléculas técnicamente diseñadas, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de único dominio, anticuerpos de dominio deleciónado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de CDR injertada, díacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (los SMIP, forma siglada de *small modular immunopharmaceuticals*) y dominios variables de IgNAR de tiburón, también están abarcadas dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno," como se usa en el presente documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos, y generalmente comprenderá al menos una CDR que está adyacente a o en fase con una o más secuencias de armazón. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V<sub>H</sub> asociado con un dominio V<sub>L</sub>, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden situarse uno respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener los dímeros V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> o V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monomérico.

En determinados aspectos, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio de fragmento constante (Fc), o estar conectado de otro modo a un dominio Fc. El término "conectado a" se refiere a una unión directa a través de un enlace covalente, o a una secuencia polipeptídica enlazadora, para reunir dos componentes, tal como un dominio variable conectado a un dominio constante. Por lo tanto, en determinados ejemplos, los dominios variables que comprenden un primer y segundo dominio de unión a antígeno, tales como los que se unen a CD3 y CD20 para formar un anticuerpo

biespecífico, están cada uno unido (o conectado) directamente a través de un enlace covalente o de una secuencia de aminoácidos enlazadora a, por ejemplo, (de N-terminal a C-terminal) dominios C<sub>H1</sub>, bisagra quimérica, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub> completos o parciales. Las configuraciones no limitantes, ejemplares, de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-bisagra-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (ii) 5 V<sub>H</sub>-bisagra-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (iv) V<sub>L</sub>-C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; (v) V<sub>L</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>; y (vi) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos (conectados) mediante una bisagra quimérica completa o parcial descrita en el presente documento, o mediante una bisagra quimérica y un C<sub>H1</sub> completo o parcial. En algunos casos, un enlazador de polipéptido (por ejemplo, de 2 a 10 10 aminoácidos) puede enlazar (conectar) los dominios variable y Fc, o puede comprender un enlace adicional con la bisagra quimérica completa o parcial y/o C<sub>H1</sub>. Una región de bisagra puede consistir en al menos aminoácidos de bisagra superior e inferior que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre los dominios variable y/o constante adyacentes en una única molécula de polipéptido. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro múltiplo) de cualquiera de las configuraciones 15 de dominios variables y constantes enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> monoméricos (por ejemplo, mediante uno o más enlaces disulfuro).

Un formato de anticuerpo multiespecífico de la divulgación, incluyendo los formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares divulgados en el presente documento, comprende normalmente al menos dos dominios variables distintos, 20 en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno distinto. Los formatos multiespecíficos pueden adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo utilizando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

Los anticuerpos pueden modificarse para tener una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) disminuida o nula, según lo medido *in vitro*. "Citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo en presencia del complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células, en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (los FcR) (por ejemplo, linfocitos citotóxicos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo 30 unido en una célula diana y, de ese modo, se da lugar a la lisis de la célula diana. La CDC y la ADCC pueden medirse usando ensayos que son muy conocidos y están disponibles en la técnica. (Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.500.362 y 5.821.337, y Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). La región constante de la cadena pesada (CH) de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo de fijar el complemento y de mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por lo tanto, la CH de un anticuerpo puede 35 seleccionarse basándose en si es conveniente que el anticuerpo medie la citotoxicidad.

En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos biespecíficos de la invención son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular en CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado 45 en secuencias de armazón humanas.

Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas realizaciones, ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresados, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (descrito más adelante con más detalle), anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria de anticuerpos humanos (descrito más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias 50 gónicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de, y están relacionadas con, las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. 60

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad de la bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de aproximadamente 150-160 kDa, en la que los dímeros se mantienen juntos por un enlace disulfuro intercatenario de cadena pesada. En una segunda forma, los dímeros no están unidos a través de enlaces disulfuro intercatenarios y 65

se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta de una cadena ligera y pesada acopladas covalentemente (semianticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de purificación por afinidad.

- 5 La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intacta se debe a, pero sin limitación, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un único aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology* 30:105) hasta los niveles normalmente observados usando una bisagra de IgG 1 humana. Los anticuerpos pueden tener una o más mutaciones en la región bisagra que en la producción pueden, por ejemplo, mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

15 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o retirado de al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en la que el anticuerpo existe de forma natural o se produce de forma natural, es un "anticuerpo aislado". Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. De acuerdo con determinados casos, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

20 Las regiones variables del anti-CD3 o anti-CD20 divulgadas en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en regiones marco conservadas y/o de CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera, en comparación con las secuencias correspondientes de la línea germinal de las que proceden los anticuerpos. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden obtenerse a partir de cualquiera de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco conservadas y/o de CDR están mutados al resto (o restos) correspondiente de la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo, o al resto (o restos) correspondiente de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución de aminoácido conservativa del resto (o restos) de la línea germinal correspondiente (tales cambios de secuencia se denominan en el presente documento colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la materia, comenzando con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En determinados casos, todos los restos de armazón y/o de CDR dentro de los dominios V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> mutan de vuelta a los restos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que procede el anticuerpo. En otros casos, únicamente determinados restos mutan de vuelta a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros casos, uno o más de los restos de armazón y/o CDR se mutan al resto (o restos) correspondiente de una secuencia de la línea germinal distinta (es decir, una secuencia de la línea germinal que es distinta de la secuencia de la línea germinal de la que procede originalmente el anticuerpo). Adicionalmente, los anticuerpos pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro de las regiones marco conservadas y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados restos individuales están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que otros restos determinados que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal distinta. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal pueden analizarse fácilmente en cuanto a una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagonista o agonistas mejoradas o potenciadas (según pueda ser el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están abarcados en el presente documento.

55 Las regiones variables del anti-CD3 o anti-CD20 pueden comprender variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o de CDR divulgadas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 pueden tener secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR expuestas en la Tabla 1 en el presente documento.

60 El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por lo tanto, distintos anticuerpos pueden unirse a distintas áreas en un antígeno o puede tener distintos efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de distintos segmentos de la cadena de polipéptido lineal. Un epítipo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptido. En determinadas

circunstancias, un epítipo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean de forma óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 95 % y, más preferentemente, al menos aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo de identidad de secuencias bien conocido, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinados casos, codificar un polipéptido que tenga la misma, o una sustancialmente similar, secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

Aplicada a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias de péptido, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT, usando ponderaciones de hueco por defecto, comparten al menos el 95 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos el 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticos difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son muy conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxil alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) las cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferentes: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se mide normalmente usando un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit, que pueden usarse con los parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de distintas especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una mutéina de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptido también pueden compararse usando FASTA usando los parámetros por defecto o los recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000), citado anteriormente). Otro algoritmo preferente cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de distintos organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando los parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

### **Moléculas de unión a antígeno biespecíficas**

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para distintos epítipos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Los anticuerpos anti-CD3xCD20 pueden unirse a o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse de forma funcional (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para producir un anticuerpo biespecífico o uno multiespecífico con una especificidad de unión adicional.

Por lo tanto, la presente divulgación incluye anticuerpos biespecíficos en donde un brazo de una inmunoglobulina se une a CD3 humano, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para un antígeno diana. El antígeno diana al que se une el otro brazo del anticuerpo biespecífico para CD3 puede ser cualquier antígeno expresado en o en la vecindad de una célula, tejido, órgano, microorganismo o virus, contra el cual se desea una respuesta inmunitaria

dirigida. El brazo de unión a CD3 puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se exponen en la Tabla 1 en el presente documento.

En el contexto de los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación, en donde un brazo del anticuerpo se une a CD3 y el otro brazo se une a un antígeno diana, el antígeno diana puede ser un antígeno asociado a tumor. Los ejemplos no limitantes de antígenos específicos asociados a tumor incluyen, por ejemplo, AFP, ALK, proteínas BAGE, BIRC5 (survivina), BIRC7,  $\beta$ -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, ciclina B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (por ejemplo, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, proteínas MAGE (por ejemplo, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 y -12), MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, antígeno de Thompson-nouvelle (Tn), TRP-1, TRP-2, tirosinasa y uroplaquina 3.

En el contexto de los anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación, en donde un brazo del anticuerpo se une a CD3 y el otro brazo se une a un antígeno diana, el antígeno diana puede ser un antígeno asociado con enfermedad infecciosa. Los ejemplos no limitantes de antígenos asociados con una enfermedad infecciosa incluyen, por ejemplo, un antígeno que se expresa en la superficie de una partícula vírica, o que se expresa preferentemente en una célula infectada con un virus, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste en VIH, hepatitis (A, B o C), virus herpes (por ejemplo, VHS-1, HSV-2, CMV, HAV-6, VVZ, virus Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus de la variolovacuna, VLTH, virus del dengue, papilomavirus, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arbovívica. Como alternativa, el antígeno diana puede ser un antígeno que se expresa en la superficie de una bacteria, o que se expresa preferentemente en una célula que está infectada por una bacteria, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *chlamydia*, *rickettsia*, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, gonococos, *klebsiella*, *proteus*, *serratia*, *pseudomonas*, *legionella*, difteria, *salmonella*, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, *leptospira* y bacteria de la enfermedad de Lyme. El antígeno diana puede ser un antígeno que se expresa en la superficie de un hongo, o que se expresa preferentemente en una célula que está infectada por un hongo, en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rizopus*, etc.), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*. El antígeno diana puede ser un antígeno que se expresa en la superficie de un parásito, o que se expresa preferentemente en una célula que está infectada por un parásito, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste en *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Taenia crassiceps* y *Brugia malayi*. Los ejemplos no limitantes de antígenos asociados a patógenos específicos incluyen, por ejemplo, gp120 del VIH, CD4 del VIH, glucoproteína L de hepatitis B, glucoproteína M de hepatitis B, glucoproteína S de hepatitis B, E1 de hepatitis C, E2 de hepatitis C, proteína específica de hepatocitos, gB del virus del herpes simple, gB de citomegalovirus y proteína de la envoltura del VLTH.

De acuerdo con determinados casos ejemplares, la presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen específicamente a CD3 y CD20. Dichas moléculas pueden denominarse en el presente documento, por ejemplo, moléculas biespecíficas "anti-CD3/anti-CD20" o "anti-CD3/CD20", o "anti-CD3xCD20" o "CD3xCD20", u otra terminología similar.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende o consiste en al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que sola o en combinación con una o más CDR adicionales y/o regiones marco conservadas (las FR), se une específicamente a un antígeno particular. Una molécula de unión a antígeno puede ser un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo, como se definen esos términos en otro lugar en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno biespecífica" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende al menos un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno. Cada dominio de unión a antígeno dentro de la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende al menos una CDR que, sola, o en combinación con una o más CDR y/o FR adicionales, se une específicamente a un antígeno particular. En el contexto de la presente divulgación, el primer dominio de unión a antígeno se une específicamente a un primer antígeno (por ejemplo, CD3), y el segundo dominio de unión a antígeno se une específicamente a un segundo, antígeno distinto (por ejemplo, CD20).

En determinados casos ejemplares de la presente divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica es un anticuerpo biespecífico. Cada dominio de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de la cadena pesada (HCVR) y un dominio variable de la cadena ligera (LCVR). En el contexto de una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un primer y un segundo dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo

"A1" y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo "A2". Por lo tanto, las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden denominarse en el presente documento A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3; y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno pueden denominarse en el presente documento A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3.

5 El primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden estar conectados directa o indirectamente entre sí para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica (es decir un ScFv biespecífico) unido además a un dominio Fc. Como alternativa, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden estar conectados cada uno a un dominio Fc distinto. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas normalmente comprenderán dos dominios Fc que son cada uno de forma individual parte de una cadena pesada de anticuerpo distinta. Los primero y segundo dominios Fc pueden ser de la misma secuencia, excepto por tener una mutación en el dominio C<sub>H3</sub> destinada a la facilitar, o por facilidad de, la purificación de moléculas heterodiméricas (es decir biespecíficas).

15 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden comprender un primer dominio C<sub>H3</sub> y un segundo dominio C<sub>H3</sub> de Ig, en donde los primero y segundo dominios de C<sub>H3</sub> de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión a Proteína A del anticuerpo biespecífico, en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. El primer dominio de C<sub>H3</sub> de Ig se puede unir a Proteína A y el segundo dominio de C<sub>H3</sub> de Ig puede contener una mutación que reduce o anula la unión a Proteína A, tal como una modificación H435R (por numeración de EU; H95R por la numeración de exones de IMGT). El segundo C<sub>H3</sub> puede comprender adicionalmente una modificación Y436F (por numeración de EU; Y96F por IMGT). Otras modificaciones que pueden encontrarse dentro del segundo C<sub>H3</sub> incluyen: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I por IMGT) en el caso de los dominios C<sub>H3</sub> de IgG1; y Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I por IMGT) en el caso de los dominios C<sub>H3</sub> de IgG4.

30 Para fabricar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas se pueden usar otros formatos o tecnologías de anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una primera especificidad de unión a antígeno puede unirse de forma funcional (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno, para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica. Los formatos biespecíficos ejemplares específicos que se pueden usar incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpo, fusiones IgG-scFv, Ig de dominio variable doble (DVD), cuadroma, botones en ojales, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con botones en ojales, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)cuerpo, cremallera de leucina, Duobody, IgG 1 /IgG2, IgG de Fab de doble acción (DAF) y formatos biespecíficos Ac<sup>m2</sup> (véase, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, y las referencias citadas en ese documento, para una revisión de los formatos anteriores).

40 En el contexto de moléculas de unión a antígeno biespecíficas, los dominios Fc pueden comprender uno o más cambios de aminoácidos (por ejemplo, inserciones, deleciones o sustituciones) en comparación con la versión quimérica especificada del dominio Fc, sin cambiar la funcionalidad deseada. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden comprender una o más modificaciones en el dominio Fc que da como resultado un dominio Fc modificado que tiene una interacción de unión modificada (por ejemplo, mejorada o disminuida) entre el Fc y el FcRn. La molécula de unión a antígeno biespecífica puede comprender una modificación en una región C<sub>H2</sub> o una C<sub>H3</sub>, en donde la modificación aumenta la afinidad del dominio Fc por el FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma, donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. La modificación puede comprender una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

### 55 Variantes de secuencias

60 Los anticuerpos y las moléculas de unión a antígeno biespecíficos pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco conservadas y/o CDR de los dominios variables de la cadena pesada y la ligera, en comparación con las secuencias correspondientes de la línea germinal de las que se obtuvieron los dominios de unión a antígeno individuales. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. Las moléculas de unión a antígeno pueden comprender dominios de unión a antígeno que se obtienen de cualquiera de las secuencias de aminoácidos ejemplares divulgadas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco conservadas y/o de CDR están mutados al resto (o restos) correspondiente de

la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo, o al resto (o restos) correspondiente de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución de aminoácido conservativa del resto (o restos) de la línea germinal correspondiente (tales cambios de secuencia se denominan colectivamente en el presente documento "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la materia, comenzando con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En determinados casos, todos los restos de armazón y/o de CDR dentro de los dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  mutan de vuelta a los restos encontrados en la secuencia original de la línea germinal de la cual procede originalmente el dominio de unión al antígeno. En otros casos, únicamente determinados restos mutan de vuelta a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros casos, uno o más de los restos de armazón y/o CDR se mutan al resto (o restos) correspondiente de una secuencia de la línea germinal distinta (es decir, una secuencia de la línea germinal que es distinta de la secuencia de la línea germinal de la que procede originalmente el dominio de unión a antígeno). Adicionalmente, los dominios de unión a antígeno pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro de las regiones marco conservadas y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados restos individuales están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que otros restos determinados que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal distinta. Una vez obtenidos, los dominios de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal pueden analizarse fácilmente en cuanto a una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagonista o agonistas mejoradas o potenciadas (según pueda ser el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están abarcadas en el presente documento.

Pueden proporcionarse moléculas de unión a antígeno en donde uno o ambos dominios de unión a antígeno comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno pueden comprender un dominio de unión a antígeno que tiene secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR descritas en el presente documento. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxil alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) las cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferentes: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia, se puede medir usando un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit, que pueden usarse con los parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de distintas especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptido también pueden compararse usando FASTA usando los parámetros por defecto o los recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000), citado anteriormente). Otro algoritmo preferente cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de distintos organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando los parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 y Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

### Unión dependiente del pH

Los anticuerpos biespecíficos anti-CD3/anti-CD20 pueden tener características de unión dependientes del pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 puede presentar una unión a CD3 reducida a pH ácido en comparación con el pH neutro. Como alternativa, los anticuerpos anti-CD3 pueden presentar una unión a CD3 potenciada a pH ácido en

comparación con el pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH menores de aproximadamente 6,2, por ejemplo, de aproximadamente 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 o menos. Como se usa en el presente documento, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

En determinados casos, la "unión reducida... a pH ácido en comparación con el pH neutro" se expresa en términos de una relación del valor de  $K_D$  de la unión del anticuerpo a su antígeno a pH ácido con respecto al valor de  $K_D$  de la unión del anticuerpo a su antígeno a pH neutro (o viceversa). Por ejemplo, puede considerarse que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta "unión reducida a CD3 a pH ácido en comparación con el pH neutro" si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta una relación de  $K_D$  a ácido/neutro de aproximadamente 3,0 o mayor. En determinados casos ejemplares, la relación de  $K_D$  a ácido/neutro para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser aproximadamente de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 o mayor.

Los anticuerpos con características de unión dependientes del pH pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la exploración de una población de anticuerpos en cuanto a la unión reducida (o potenciada) a un antígeno particular a pH ácido en comparación con el pH neutro. Adicionalmente, las modificaciones del dominio de unión a antígeno a nivel de aminoácidos pueden producir anticuerpos con características dependientes del pH. Por ejemplo, mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, dentro de una CDR) con un resto de histidina, se puede obtener un anticuerpo con unión a antígeno reducida a pH ácido con respecto al pH neutro.

#### Unión al receptor de Fc

Se proporcionan moléculas de unión a antígeno y anticuerpos biespecíficos anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación que comprenden un dominio Fc quimérico, tal como un dominio constante bisagra-CH2-CH3 de una cadena pesada de Ig, procedente de distintos isotipos de IgG y que tiene características únicas con respecto a la unión y activación del receptor Fc. Determinados dominios Fc de la divulgación están diseñados técnicamente para comprender una bisagra quimérica. En un anticuerpo biespecífico de la invención, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde el dominio Fc quimérico comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de la bisagra superior de IgG 1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración de EU);
- (b) una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana que comprende PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) de las posiciones 228 a 236 (numeración de EU);
- (c) un dominio CH1 de IgG1 humana y un dominio CH3 de IgG1 humana, o un dominio CH1 de IgG4 humana y un dominio CH3 de IgG4 humana; y
- (d) una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración de EU).

El término "quimérico", como se usa en el presente documento, significa compuesto de partes de distinto origen. La frase "proteína quimérica" incluye una primera proteína aminoacídica unida a una segunda proteína aminoacídica que normalmente no están unidas en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos normalmente pueden existir como proteínas separadas o en una disposición distinta en la misma proteína, y se unen en un polipéptido de fusión en una nueva disposición. Las proteínas quiméricas se pueden crear mediante diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis química o creando un polinucleótido que codifique los aminoácidos de la proteína quimérica en la disposición deseada. Las proteínas quiméricas ejemplares incluyen las secuencias de bisagra quiméricas que conectan los dominios de la cadena pesada de IgG, y las proteínas de fusión diseñadas técnicamente para fabricar los anticuerpos y las proteínas de unión a antígeno humanas.

Las proteínas quiméricas divulgadas en el presente documento se diseñaron para minimizar la creación de epítomos inmunogénicos en las uniones, por ejemplo, en comparación con una región o dominio Fc de IgG de tipo silvestre. Por lo tanto, las proteínas diseñadas técnicamente tienen inmunogenicidad reducida y presentan una unión reducida a los receptores de Fc, así como funciones efectoras reducidas o nulas.

El término "bisagra", como se usa en el presente documento, pretende incluir la región de restos de aminoácidos consecutivos que conectan el extremo C del  $C_{H1}$  al extremo N del dominio  $C_{H2}$  de una inmunoglobulina. Varios aminoácidos del extremo N del dominio  $C_{H2}$ , que están codificados por el exón  $C_{H2}$ , también se consideran parte de la "bisagra inferior". Sin quedar ligado a teoría alguna, los aminoácidos de la región bisagra de las IgG 1, IgG2 e IgG4 se han caracterizado como que comprenden 12-15 aminoácidos consecutivos codificados por un exón de bisagra distinto, y varios aminoácidos N-terminales del dominio  $C_{H2}$  (codificado por el exón  $C_{H2}$ ) (Brekke, O.H., *et al.* Immunology Today 16(2):85-90 (1995)). Por otro lado, la IgG3 comprende una región de bisagra que consiste en cuatro segmentos: un segmento superior que se asemeja a la región bisagra de IgG 1, y 3 segmentos que son repeticiones idénticas de aminoácidos exclusivos de IgG3.

La expresión "bisagra quimérica", como se usa en el presente documento, pretende incluir una proteína quimérica que comprende una primera secuencia de aminoácidos procedente de la región bisagra de una molécula de Ig y una segunda secuencia de aminoácidos procedente de la región bisagra de una clase o subclase distinta de molécula de Ig. Las bisagras quiméricas ejemplares comprenden una primera secuencia de aminoácidos, o una secuencia de "bisagra superior", procedente de una región bisagra de IgG 1 humana o región bisagra de IgG4 humana, y una segunda secuencia de aminoácidos, o una secuencia de "bisagra inferior", procedente de una región bisagra IgG2 humana. La primera secuencia o secuencia de "bisagra superior" puede comprender los restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración de EU. La segunda secuencia o secuencia de "bisagra inferior" puede comprender los restos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración de EU. En un anticuerpo biespecífico de la invención, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos de la bisagra superior de IgG 1 humana o de IgG4 humana, de las posiciones 216 a 227 (numeración de la EU) y una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana que comprende PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) de las posiciones 228 a 236 (numeración de EU).

Para los fines de la presente divulgación, una región de "bisagra superior" está destinada a incluir los restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración de EU (restos de aminoácidos de las posiciones 226 a 240 de acuerdo con la numeración de Kabat) (véase la Figura 1). Una región de "bisagra inferior" está destinada a incluir los restos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración de EU (restos de aminoácidos de las posiciones 241 a 249 de acuerdo con la numeración de Kabat) (véase la Figura 1).

En la presente divulgación, para la conveniencia del practicante de la invención, los aminoácidos de la región bisagra de IgG 1, IgG2 e IgG4 humanas se han sido identificadas en el presente documento mediante el sistema de numeración de EU de Kabat (Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological interest. 5ª ed. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., n.º de publicación del NIH 91-3242 (1991)), también conocido como "numeración de EU" o "índice de EU", según lo actualizado de acuerdo con la Tabla Científica del IMGT®, IMGT®, el ImMunoGeneTics information system® internacional, [http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html), creado: el 17 de mayo de 2001, última actualización: 10 de enero de 2013.

La correspondencia entre la numeración de EU para los aminoácidos de la bisagra de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas y la numeración de dominios únicos del IMGT, la numeración de exones del IMGT y las convenciones de numeración de Kabat (véase también Kabat, E.A. *et al.*, 1991, citado anteriormente) se describe a continuación en las tablas A a F:

Tabla A: Numeración de la bisagra de IgG 1

Aminoácidos de IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración exclusiva para la <b>BISAGRA</b> <sup>a</sup> de IMGT	Numeración de exones de IMGT <sup>a</sup>	Numeración de EU	Numeración de Kabat
(E)	1	1	216	226
P	2	2	217	227
K	3	3	218	228

(continuación)

Aminoácidos de IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración exclusiva para la <b>BISAGRA</b> <sup>a</sup> de IMGT	Numeración de exones de IMGT <sup>a</sup>	Numeración de EU	Numeración de Kabat
S	4	4	219	232 <sup>a</sup> [229] <sup>b</sup>
C	5	5	220	233 <sup>a</sup> [230] <sup>b</sup>
D	6	6	221	234 <sup>a</sup> [232] <sup>b</sup>
K	7	7	222	235
T	8	8	223	236
H	9	9	224	237
T	10	10	225	238
C	11	11	226	239
P	12	12	227	240
P	13	13	228	241
C	14	14	229	242
P	15	15	230	243

Tabla B: Numeración de la bisagra del dominio C de IgG 1

Aminoácidos de IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración exclusiva para los <b>dominios C</b> <sup>a</sup> del IMGT	Numeración de exones del IMGT <sup>a</sup>	Numeración de EU	Numeración de Kabat
(A)	1,6	1	231	244
P	1,5	2	232	245

E	1,4	3	233	246
L	1,3	4	234	247
L	1,2	5	235	248
G	1,1	6	236	249

Tabla C: Numeración de la bisagra de IgG2

Aminoácidos de IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Numeración exclusiva para la <b>BISAGRA</b> <sup>a</sup> de IMGT	Numeración de exones de IMGT <sup>a</sup>	Numeración de EU	Numeración de Kabat
(E)	1	1	216	226
R	2	2	217	227
K	3	3	218	228
C	4	4	219 <sup>a</sup> (221) <sup>b</sup>	232
C	5	5	220 <sup>a</sup> (-) <sup>b</sup>	233
V	6	6	222	235
E	7	7	224	237
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
P	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

Tabla D: Numeración de la bisagra del dominio C de IgG2

Aminoácidos de IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Numeración de EU	Numeración de Kabat
(A)	231	244
P	232	245
P	233	246
V	234	247
A	235	248
--	236	249

5

Tabla E: Numeración de la bisagra de IgG4

Aminoácidos de IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Numeración exclusiva para la <b>BISAGRA</b> <sup>a</sup> de IMGT	Numeración de exones de IMGT <sup>a</sup>	Numeración de EU	Numeración de Kabat
(E)	1	1	216	226
S	2	2	217	227
K	3	3	218	228
Y	4	4	- <sup>a</sup> (219) <sup>b</sup>	229

(continuación)

Aminoácidos de IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Numeración exclusiva para la <b>BISAGRA</b> <sup>a</sup> de IMGT	Numeración de exones de IMGT <sup>a</sup>	Numeración de EU	Numeración de Kabat
G	5	5	- <sup>a</sup> (220) <sup>b</sup>	230
P	6	6	224	237
P	7	7	225	238
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
S	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

10

Tabla F: Numeración de la bisagra del dominio C de IgG4

Aminoácidos de IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Numeración de EU	Numeración de Kabat
(A)	231	244
P	232	245
E	233	246
F	234	247
L	235	248
G	236	249

Los aminoácidos resultantes del corte y empalme de exones se muestran entre paréntesis.

- significa que no se informó el número correspondiente

-- significa que no hay un aminoácido correspondiente en esta posición

<sup>a</sup> numeración de acuerdo con la última Tabla Científica del IMGT actualizada

<sup>b</sup> numeración de acuerdo con el índice de EU según lo informado en Kabat, EA, *et al.* 1991

Véase también, por ejemplo, Lefranc, M.-P. *et al.*, *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. *et al.* *PNAS USA*, 63:78-85 (1969).

5 El término "unión", en el contexto de la unión de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión de anticuerpo o proteína que contiene Fc a, por ejemplo, un antígeno predeterminado o a un FcγR, normalmente se refiere a una interacción o asociación entre un mínimo de dos entidades, o estructuras moleculares, tal como una interacción anticuerpo-antígeno, o una proteína que contiene Fc a un FcγR.

10 Por ejemplo, la afinidad de unión normalmente corresponde a un valor de  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos, cuando se determina por, por ejemplo, la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, forma siglada de *surface plasmon resonance*) en un instrumento BIAcore 3000, utilizando el antígeno o FcR como el ligando y el anticuerpo, Ig, fragmento de unión de anticuerpo o proteína que contiene Fc como el analito (o antiligando). Por consiguiente, el anticuerpo u otra proteína de unión se une al antígeno o receptor predeterminado con una afinidad correspondiente a un valor de  $K_D$  valor que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína).

20 El término " $K_D$ " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular, o a la constante de disociación en el equilibrio de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión de anticuerpo o proteína que contiene Fc a un FcγR. Existe una relación inversa entre la  $K_D$  y afinidad de unión, por lo tanto, cuanto más pequeño es el valor de la  $K_D$ , más alta, es decir, más fuerte, es la afinidad. Por lo tanto, las expresiones "afinidad más alta" o "afinidad más fuerte" se refieren a una mayor capacidad de formar una interacción y, por lo tanto, a un valor de  $K_D$  más pequeño y, por el contrario, las expresiones "afinidad más baja" o "afinidad más débil" se refieren a una menor capacidad de formar una interacción y, por lo tanto, a un valor de  $K_D$  más grande. En algunas circunstancias, una afinidad de unión (o  $K_D$ ) más alta de una molécula particular (por ejemplo, un anticuerpo) a su molécula asociada interactiva (por ejemplo, un receptor X) en comparación con la afinidad de unión de la molécula (por ejemplo, un anticuerpo) a otra molécula asociada interactiva (por ejemplo, un receptor Y), puede expresarse como una relación de unión, determinada dividiendo el valor de  $K_D$  más grande (afinidad más baja o más débil) por el valor de  $K_D$  más pequeño (afinidad más alta o más fuerte), por ejemplo, expresado como una afinidad de unión 5 veces o 10 veces mayor, según el caso.

30 El término " $k_d$ " (s<sup>-1</sup> o 1/s), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de una interacción particular antígeno-anticuerpo, o la constante de disociación de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión de anticuerpo o proteína que contiene Fc a un FcγR. Dicho valor también se denomina valor de  $k_{off}$ .

35 El término " $k_a$ " (M<sup>-1</sup> x s<sup>-1</sup> o 1/M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante asociación de una interacción particular antígeno-anticuerpo, o la constante de asociación de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión de anticuerpo o proteína que contiene Fc a un FcγR.

40 El término " $k_a$ " (M<sup>-1</sup> o 1/M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante asociación en el equilibrio de una interacción particular antígeno-anticuerpo, o la constante de asociación en el equilibrio de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión de anticuerpo o proteína que contiene Fc a un FcγR. La constante de asociación en el equilibrio se obtiene dividiendo la  $k_a$  por la  $k_d$ .

45 El término "CE<sub>50</sub>" o "CE<sub>50</sub>", como se usa en el presente documento, se refiere a la mitad de la concentración eficaz máxima, que incluye la concentración de un anticuerpo que induce una respuesta a medio camino entre el basal y el máximo después de un tiempo de exposición específico. La CE<sub>50</sub> representa esencialmente la concentración de un anticuerpo donde se observa el 50 % de su efecto máximo. Por lo tanto, se observa una unión reducida con un aumento de la CE<sub>50</sub>, o valor de la mitad de la concentración eficaz máxima.

50 En una realización, disminución de la unión se puede definir como un aumento de la concentración de anticuerpos CE<sub>50</sub> que permite la unión a la cantidad semimáxima de células diana.

55 En algunas realizaciones, una actividad citotóxica disminuida, tal como la ADCC o la CDC, se puede definir como un aumento de la concentración de anticuerpos CE<sub>50</sub> que permite la lisis de la cantidad semimáxima de células diana. La citotoxicidad también se mide como porcentaje de citotoxicidad, o porcentaje de lisis, que es la fracción de una población total de células observada como lisada en un ensayo de liberación de calceína o un ensayo equivalente. El porcentaje de citotoxicidad se puede medir como se describe en el Ejemplo 6.

En otras realizaciones, proliferación disminuida se puede definir como un aumento de la concentración de anticuerpos

CE<sub>50</sub> que permite la proliferación de la cantidad semimáxima de células diana.

La frase "funciones efectoras", como se usa en el presente documento, pretende incluir las capacidades funcionales impartidas por una proteína que contiene Fc al unirse a un FcγR. Sin quedar ligado a teoría alguna, la formación de un complejo Fc/FcγR recluta una diversidad de células efectoras en punto de antígeno unido, lo que normalmente da como resultado diversos sucesos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunitarias posteriores.

Las proteínas de unión a antígeno y anticuerpos que contienen Fc quimérico descritos en el presente documento presentan funciones efectoras alteradas o reducidas en comparación con las proteínas de unión a antígeno o anticuerpos que contienen Fc de tipo silvestre correspondientes. Véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2014/121087, publicada el 7 de agosto de 2014.

La función efectora que está reducida o alterada puede ser una función efectora citotóxica, por ejemplo, citotoxicidad, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). La función efectora que está reducida o alterada puede ser la citotoxicidad dependiente del complemento. La función efectora que está reducida o alterada puede ser la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. La función efectora que está reducida o alterada puede ser la proliferación celular de las células diana.

Varias funciones efectoras de los anticuerpos están mediadas, al menos en parte, por los receptores de Fc (los FcR), los cuales se unen a la región Fc de un anticuerpo en el dominio constante (específicamente, el dominio CH2 y CH3) de una inmunoglobulina típica. Hay varios receptores de Fc que son específicos para las distintas clases de inmunoglobulinas, es decir, IgG, IgE, IgA, IgM e IgD. La familia del receptor de Fc de IgG humano se divide en tres grupos: FcγRI (CD64), que tiene la capacidad de unirse a IgG con alta afinidad, FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), ambos receptores de baja afinidad. Cada subclase de FcγR está codificada por dos o tres genes, y el corte y empalme de ARN alternativo conduce a múltiples transcritos, por tanto, existe una amplia diversidad en las isoformas de FcγR (por ejemplo, FcγRIA (CD64; FCGR1A), FcγRIB (CD64; FCGR1B), FcγRIIA (CD32A; FCGR2A), FcγRIIB (CD32B; FCGR2B), FcγRIIC (CD32C; FCGR2C), FcγRIIIA (CD16a; FCGR3A) y FcγRIIIB (CD16b; FCGR3B)). Adicionalmente, el FcRn, o receptor de Fc neonatal (también conocido como el transportador de receptor de Fc, alfa o FCGRT) tiene la capacidad de transferir anticuerpos IgG de la madre al feto a través de la placenta. Adicionalmente, los receptores de Fc se expresan en una diversidad de células, incluyendo, por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y determinados linfocitos. Por ejemplo, las células U937, una línea celular de monocitos humanos, expresan tanto FcγRI como FcγRIIA (véase, por ejemplo, Jones y *et al.* J Immunol 135(5):3348-53 (1985); y Brooks, *et al.* J Exp Med 170:1369-85 (octubre de 1989)). Cada receptor al que se hace referencia en el presente documento incluye cualquier forma funcional conocida del receptor, entre ellas las variantes de transcripción, isoformas y polimorfismos.

La unión de un Fc de Ig a su receptor lleva a estas células efectoras a los puntos del antígeno unido, dando como resultado en última instancia una diversidad de respuestas de señalización e inmunitarias, entre ellas la activación de linfocitos B, respuestas inflamatorias, respuestas citotóxicas y respuestas fagocíticas. Como tal, la unión reducida o alterada de un Fc de Ig a su receptor puede dar como resultado funciones efectoras reducidas.

La frase "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos" o "ADCP", se refiere a una función efectora que elimina (o destruye) una célula diana al engullir la célula diana en lugar de inducir la citólisis. La ADCP puede ser un importante mecanismo *in vivo* para destruir células tumorales. La ADCP se puede medir mediante métodos de citometría de flujo de fluorescencia de dos colores, por ejemplo, métodos que utilizan, por ejemplo, PKH2 (colorante verde fluorescente) y anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (rojo) contra distintas proteínas de la superficie celular, para diferenciar las células de ensayo, determinando así la actividad fagocítica y la tasa de fagocitosis. Las mediciones de la ADCP son bien conocidas en la técnica. Las estrategias terapéuticas que activan selectivamente el FcγRIIA con respecto al FcγRIIB pueden potenciar la actividad fagocítica de los macrófagos (Richards, JO, *et al.* 2008 Mol Cancer Ther 7(8):2517-27). Las proteínas de unión a antígeno y anticuerpos que contienen Fc quimérico de la divulgación se unen y activan al FcγRIIA humano. Las proteínas y anticuerpos de unión a antígeno pueden unirse al FcγRIIA humano con una afinidad de unión más alta que los anticuerpos que se unen al FcγRIIB. El anticuerpo puede presentar una afinidad de unión al FcγRIIA humano más de aproximadamente 5 veces más fuerte que su afinidad de unión al FcγRIIB humano, expresado tales valores de afinidad de unión en K<sub>D</sub>. El anticuerpo puede presentar una afinidad de unión al FcγRIIA humano más de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces más fuerte que su afinidad de unión al FcγRIIB humano. En la invención, el anticuerpo biespecífico presenta una mayor afinidad de unión por FcγRIIA humano con respecto a FcγRIIB humano, y presenta poca o ninguna afinidad de unión detectable por FcγRI humano y FcγRII I humano, medido en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

#### **60 Características biológicas de los anticuerpos y moléculas de unión a antígeno biespecíficos**

La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 y a CD20. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos proporcionados para su uso en la invención pueden unirse a células Jurkat (CD3+) y a células Raji (CD20+) con un valor de CE<sub>50</sub> de menos de aproximadamente 60 nM, medido por un ensayo de unión *in vitro*, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento (por ejemplo, evaluando la unión de las células Jurkat o las células Raji a los anticuerpos CD3xCD20), o

un ensayo sustancialmente similar. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden unirse a CD3 o CD20 en la superficie de la célula (por ejemplo, un célula Jurkat y/o célula Raji) con un valor de  $CE_{50}$  de menos de aproximadamente 75 nM, menos de aproximadamente 70 nM, menos de aproximadamente 65 nM, menos de aproximadamente 60 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 40 nM, menos de aproximadamente 30 nM o menos de aproximadamente 25 nM, medido por un ensayo de unión *in vitro*, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 4 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, tales como los anticuerpos biespecíficos proporcionados para su uso en la invención) que son capaces de unirse simultáneamente a CD3 humano y CD20 humano. De acuerdo con determinados casos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la divulgación interactúan específicamente con células que expresan CD3 y/o CD20. El grado en que una molécula de unión a antígeno biespecífica se une a las células que expresan CD3 y/o CD20 puede evaluarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), como se ilustra en el Ejemplo 4 en el presente documento. Por ejemplo, la presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen específicamente a líneas de linfocitos T humanos que expresan CD3 (por ejemplo, Jurkat), líneas de linfocitos B humanos que expresan CD20 (por ejemplo, Raji) y linfocitos T de primates (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica de cinomolgo [las CMSP]). La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a cualquiera de las células y líneas celulares mencionadas anteriormente con un valor de  $CE_{50}$  de aproximadamente  $8,74 \times 10^{-6}$  a aproximadamente  $5,99 \times 10^{-8}$ , o menos, determinado usando un ensayo FACS como se expone en el Ejemplo 4, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 e inducen la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-CD3xCD20 que inducen la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T con una  $CE_{50}$  de menos de aproximadamente 60 pM, medido en un ensayo *in vitro* de destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 en el presente documento (por ejemplo, evaluando el grado de destrucción de células tumorales Raji por CMSP humanas en presencia de anticuerpos anti-CD3), o un ensayo sustancialmente similar. En determinadas realizaciones, los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden inducir la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T (por ejemplo, la destrucción de células Raji mediada por CMSP) con un valor de  $CE_{50}$  de menos de aproximadamente 56 pM, menos de aproximadamente 50 pM, menos de aproximadamente 45 pM, menos de aproximadamente 40 pM, menos de aproximadamente 35 pM, menos de aproximadamente 30 pM, menos de aproximadamente 25 pM, menos de aproximadamente 20 pM, menos de aproximadamente 15 pM, menos de aproximadamente 10 pM, menos de aproximadamente 5 pM o menos de aproximadamente 1 pM, medido por un ensayo *in vitro* de destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3/CD20 humanos e inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), aunque en menor medida que los anticuerpos que tienen un dominio Fc de IgG de tipo silvestre. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico para su uso en la presente invención puede inducir la destrucción por CDC de células Raji o Daudi (que expresan CD20) con una citotoxicidad porcentual (% de citotoxicidad o % de lisis celular) de menos de aproximadamente el 50 %, medido en un ensayo *in vitro* de destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 en el presente documento (por ejemplo, evaluando el grado de destrucción de células diana (Raji o Daudi) en presencia del complemento y de anticuerpos anti-CD3xCD20), o un ensayo sustancialmente similar. En determinadas realizaciones, los anticuerpos para su uso en la presente invención inducen la destrucción de células por CDC (por ejemplo, la destrucción de células Raji o células Daudi mediada por el complemento) con una citotoxicidad porcentual de menos de aproximadamente el 45 %, menos de aproximadamente el 40 %, menos de aproximadamente el 35 %, menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 25 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 1 %, menos de la citotoxicidad basal, o sin citotoxicidad detectable, medido por un ensayo *in vitro* de destrucción de células tumorales mediada por el complemento, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3/CD20 humanos que no inducen de forma significativa citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en comparación con los anticuerpos que tienen un dominio Fc de IgG de tipo silvestre. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo biespecífico para su uso en la invención sin destrucción apreciable de células Raji o Daudi (que expresan CD20) con una citotoxicidad porcentual (% de citotoxicidad o % de lisis celular) de menos de aproximadamente el 20 % (o menos que la citotoxicidad basal), medido en un ensayo *in vitro* de destrucción celular mediada por linfocitos NK, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 7 en el presente documento (por ejemplo, evaluando el grado de destrucción de células diana (Raji o Daudi) en presencia de células NK y de anticuerpos anti-CD3xCD20), o un ensayo sustancialmente similar. Los ensayos sustancialmente similares pueden incluir la presencia de linfocitos NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos u otras células que expresan FcγRIII,

- incluyendo células que expresan una variante del FcγRIII. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno no presentan actividad ADCC detectable (por ejemplo, destrucción de células Raji o células Daudi mediada por linfocitos NK o por FcγRIII) con una citotoxicidad porcentual de menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 25 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 1 %, menos de la citotoxicidad basal, o sin actividad citotóxica detectable, medido por un ensayo *in vitro* de destrucción de células mediada por FcγRIII, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.
- De acuerdo con determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico para su uso en la presente invención se une a FcγRIIA humano (por ejemplo, a 25 °C) con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 23,5 μM medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en el presente documento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a FcRIIA con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 20,5 μM, menos de aproximadamente 20 μM, menos de aproximadamente 19,3 μM, menos de aproximadamente 18 μM, menos de aproximadamente 17 μM, menos de aproximadamente 16 μM, menos de aproximadamente 15 μM, menos de aproximadamente 10 μM, menos de aproximadamente 9 μM, menos de aproximadamente 8 μM, menos de aproximadamente 7 μM, menos de aproximadamente 6 μM, menos de aproximadamente 5 μM, menos de aproximadamente 4 μM, menos de aproximadamente 3 μM, menos de aproximadamente 2 μM, menos de aproximadamente 1 μM, menos de aproximadamente 900 nM, menos de aproximadamente 800 nM o menos de aproximadamente 700 nM, medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en el presente documento (por ejemplo, un formato de captura por AcM o de captura por antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.
- De acuerdo con determinadas realizaciones, el anticuerpo biespecífico para su uso en la presente invención se une a FcγRIIB humano (por ejemplo, a 25 °C) con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 233 μM medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en el presente documento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a FcRIIB con una  $K_D$  de menos de aproximadamente 200 μM, menos de aproximadamente 190 μM, menos de aproximadamente 180 μM, menos de aproximadamente 170 μM, menos de aproximadamente 160 μM, menos de aproximadamente 150 μM, menos de aproximadamente 140 μM, menos de aproximadamente 130 μM, menos de aproximadamente 125 μM, menos de aproximadamente 123 μM, menos de aproximadamente 120 μM, menos de aproximadamente 110 μM, menos de aproximadamente 100 μM, menos de aproximadamente 90 μM, menos de aproximadamente 80 μM, menos de aproximadamente 70 μM, menos de aproximadamente 60 μM, menos de aproximadamente 50 μM o menos de aproximadamente 40 μM, medido por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en el presente documento (por ejemplo, un formato de captura por AcM o de captura por antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.
- El anticuerpo biespecífico para su uso en la invención puede unirse a CD3xCD20 con una semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) mayor de aproximadamente 8 días, medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 9 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En determinadas realizaciones, los anticuerpos presentan una  $t_{1/2}$  mayor que aproximadamente 5 días, mayor que 6 días, mayor que aproximadamente 7 días, mayor que aproximadamente 8 días, mayor que aproximadamente 9 días, mayor que aproximadamente 10 días, mayor que aproximadamente 11 días, mayor que aproximadamente 12 días, mayor que aproximadamente 13 días, mayor que aproximadamente 14 días, mayor que aproximadamente 15 días o menor que aproximadamente 20 días, medido por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 9 en el presente documento (por ejemplo, un formato de captura por AcM o de captura por antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.
- En algunos casos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 descritas en el presente documento no presentan actividad sustancial en uno o más ensayos seleccionados del grupo que consiste en: (a) inducción de la proliferación de CMSP *in vitro*; (b) citotoxicidad por CDC (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6 en el presente documento); (d) ADCC (véase, por ejemplo, el Ejemplo 7 en el presente documento).
- El anticuerpo biespecífico para su uso en la invención puede presentar actividad sustancial en uno o más ensayos seleccionados del grupo que consiste en: (a) empobrecimiento de linfocitos B (por ejemplo, linfocitos B CD45+/CD20+) en monos cinomolgo (véase, por ejemplo, los Ejemplos 10 y 11 en el presente documento); (b) disminución del volumen del tumor de linfocitos B (por ejemplo, volumen de tumor Raji) en modelos de ratones inmunodeficientes (véase, por ejemplo, el Ejemplo 12A); y (c) regresión de tumores en modelos de ratón con tumores establecidos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 12B).
- La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecífico anti-CD3/anti-CD20 que tienen la capacidad de empobrecer los linfocitos B en un sujeto (véase, por ejemplo, el Ejemplo 10). Por ejemplo, de acuerdo con determinadas realizaciones, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde una única administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica a un sujeto (por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,9 mg/kg, de aproximadamente 0,8 mg/kg, de aproximadamente

0,7 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,4 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, o menos) provoca una reducción del número de linfocitos B en el sujeto (por ejemplo, en una muestra de sangre tomada del sujeto) por debajo de niveles detectables. En determinadas realizaciones, una única administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 a una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg provoca una reducción del número de linfocitos B en el sujeto por debajo de niveles detectables aproximadamente en el día 7, aproximadamente en el día 6, aproximadamente en el día 5, aproximadamente en el día 4, aproximadamente en el día 3, aproximadamente en el día 2, o aproximadamente en el día 1 después de la administración al sujeto de la molécula de unión a antígeno biespecífica. De acuerdo con determinadas realizaciones, una única administración de una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la invención, a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg, provoca que el número de linfocitos B permanezca por debajo de los niveles detectables hasta al menos aproximadamente 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días o más, después de la administración. Como se usa en el presente documento, la expresión "por debajo de niveles detectables" significa que no se pueden detectar linfocitos B directa o indirectamente en una muestra de sangre extraída de un sujeto, utilizando ensayos convencionales de detección de linfocitos B, por ejemplo, un ensayo FACS para marcadores de linfocitos B, como se expone en el Ejemplo 10, en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 que, cuando se administran a un sujeto, no provocan más que una disminución transitoria de los linfocitos T. Por ejemplo, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 que, cuando se administran a un sujeto a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg, provocan que el número de linfocitos T disminuya en el día 1 después de la administración, pero en donde el número de linfocitos T por microlitro de sangre rebota en los puntos de tiempo posteriores (por ejemplo, en aproximadamente el día 2, día 4, día 7, día 14, día 28 o más tarde, después de la administración). Por ejemplo, se puede proporcionar una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20, en donde el número de linfocitos T por microlitro de sangre extraída del sujeto en aproximadamente el día 4 hasta aproximadamente el día 7 después de la administración al sujeto de la molécula de unión a antígeno a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg o aproximadamente 0,1 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg, es equivalente o mayor que el número de linfocitos T por microlitro de sangre extraída del sujeto antes de la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica, detectado mediante ensayos convencionales de detección de linfocitos T, por ejemplo, un ensayo FACS para marcadores de linfocitos T, como se expone en el Ejemplo 10, en el presente documento.

### 35 Mapeo epitópico y tecnologías relacionadas

El epítipo en CD3 o en CD20 al que se unen las moléculas de unión a antígeno de la presente invención puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína CD3. Como alternativa, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos (o secuencias de aminoácidos) no contiguos de CD3 o CD20. Los anticuerpos de la invención pueden interactuar con aminoácidos contenidos dentro de una única cadena CD3 (por ejemplo, CD3-épsilon, CD3-delta o CD3-gamma), o pueden interactuar con aminoácidos de dos o más cadenas de CD3 distintas. El término "epítipo", como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por lo tanto, distintos anticuerpos pueden unirse a distintas áreas en un antígeno o puede tener distintos efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de distintos segmentos de la cadena de polipéptido lineal. Un epítipo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptido. En determinadas circunstancias, un epítipo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

Pueden usarse diversas técnicas conocidas para los expertos en la materia para determinar si un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ejemplares incluyen, por ejemplo, ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis mutacional de barrido con alanina, análisis de transferencias de péptidos (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463) y análisis de escisión de péptidos. Además, pueden emplearse métodos tales como escisión de epítipos, extracción de epítipos y modificación química de antígenos (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica el marcaje con deuterio de la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que tenga lugar el intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los restos excepto en los restos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión por proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando de esta manera los restos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo,

Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. También se puede usar cristalografía de rayos X del complejo de antígeno/anticuerpo con el fin de realizar un mapeo epitópico.

5 La presente divulgación incluye adicionalmente anticuerpos anti-CD3 que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos específicos ejemplares descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se exponen en la Tabla 1 en el presente documento). Asimismo, la presente divulgación también incluye anticuerpos anti-CD3 que compiten por la unión a CD3 con cualquiera de los anticuerpos específicos ejemplares descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se exponen en la Tabla 1 en el presente documento).

15 La presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo en CD3 que los dominios de unión a antígeno específicos de CD3 ejemplares específicos descritos en el presente documento, y/o en donde el primer dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo en CD20 que los dominios de unión a antígeno específicos de CD20 ejemplares específicos descritos en el presente documento.

20 Asimismo, la presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno compite por la unión a CD3 con cualquiera de los dominios de unión a antígeno específicos de CD3 ejemplares específicos descritos en el presente documento, y/o en donde el segundo dominio de unión a antígeno compite por la unión a CD20 con cualquiera de los dominios de unión a antígeno específicos de CD20 ejemplares específicos descritos en el presente documento.

30 En un aspecto, la presente divulgación incluye un anticuerpo biespecífico en el que un primer dominio de unión a antígeno compite por la unión a CD3 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3) y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (A1-LCDR1, A1-LCDR2 y A1-LCDR3), en donde (i) A1-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; (ii) A1-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (iii) A1-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; (iv) A1-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; (v) A1-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y (vi) A1-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia que comprende (i) la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (HCVR) de la SEQ ID NO: 10, y (ii) la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (LCVR) de la SEQ ID NO: 18.

40 En otro aspecto, la presente divulgación incluye un anticuerpo biespecífico en el que un segundo dominio de unión a antígeno compite por la unión a CD20 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia, que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3) y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (A2-LCDR1, A2-LCDR2 y A2-LCDR3), en donde (i) A2-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; (ii) A2-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (iii) A2-HCDR3 comprende la SEQ ID NO: 8; (iv) A2-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; (v) A2-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y (vi) A2-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende un segundo dominio de unión a antígeno que compite por la unión a CD20 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia que comprende (i) una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y (ii) una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

55 En otro aspecto, la presente divulgación incluye un anticuerpo biespecífico que tiene un primer dominio de unión a antígeno que compite por la unión a CD3 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia que comprende (i) una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, y (ii) una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; y que tiene un segundo dominio de unión a antígeno que compite por la unión a CD20 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia que comprende (iii) una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

65 Se puede determinar fácilmente si una molécula de unión a antígeno particular (por ejemplo, un anticuerpo) o un dominio de unión a antígeno de la misma se une al mismo epítipo o compite por unirse con, una molécula de unión a antígeno de referencia usando métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo en CD3 (o CD20) que una molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia, se permite que la molécula biespecífica de referencia se una en primer lugar a una proteína CD3 (o

proteína CD20). A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba de unirse a la molécula CD3 (o CD20). Si el anticuerpo de prueba puede unirse a CD3 (o CD20) después de la unión con saturación con la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo distinto de CD3 (o CD20) que la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no puede unirse a la molécula CD3 (o CD20) después de la unión con saturación con la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo de CD3 (o CD20) que el epítipo al que se unió a la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia. Entonces puede llevarse a cabo experimentación rutinaria adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de prueba se debe, de hecho, a la unión al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo pueden realizarse usando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión de anticuerpos disponible en la técnica. En conformidad con determinadas realizaciones de la presente invención, dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo epítipo (o a epítopos solapantes) si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de una proteína de unión a antígeno inhibe la unión de la otra en al menos un 50 %, pero preferentemente en un 75 %, 90 % o incluso un 99 %, medida en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Como alternativa, se considera que dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reducen o eliminan la unión de la otra. Se considera que dos proteínas de unión a antígeno tienen "epítopos solapantes" si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácido que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reducen o eliminan la unión de la otra.

Para determinar si un anticuerpo o dominio de unión a antígeno del mismo compete por la unión con una molécula de unión a antígeno de referencia, se realiza la metodología de unión descrita anteriormente en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que la molécula de unión a antígeno de referencia se una a una proteína CD3 (o proteína CD20) en condiciones de saturación, seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula CD3 (o CD20). En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de CD3 (o CD20) en condiciones de saturación, seguido de la evaluación de la unión de la molécula de unión a antígeno de referencia a la molécula de CD3 (o CD20). Si en ambas orientaciones, solo la primera molécula de unión a antígeno (saturante) tiene la capacidad de unirse a la molécula CD3 (o CD20), entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y la molécula de unión a antígeno de referencia compiten por la unión a CD3 (o CD20). Como apreciará un experto en la materia, un anticuerpo que compite por la unión con una molécula de unión a antígeno de referencia no necesariamente se une al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, sino que puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia mediante la unión a un epítipo solapante o adyacente.

### Preparación de dominios de unión a antígeno y construcción de moléculas biespecíficas

Los dominios de unión a antígeno específicos para antígenos particulares pueden prepararse mediante cualquier tecnología de generación de anticuerpos conocida en la técnica. Una vez obtenidos, dos dominios de unión a antígeno distintos, específico para dos antígenos distintos (por ejemplo, CD3 y CD20), pueden disponerse entre sí de forma apropiada para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica utilizando métodos de rutina. (En otro lugar en el presente documento se proporciona un análisis de formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares que se pueden usar para construir las moléculas de unión a antígeno biespecíficas). En determinados casos, uno o más de los componentes individuales (por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras) de las moléculas de unión a antígeno multiespecíficas se obtienen de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Los métodos para fabricar tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una o más de las cadenas pesada y/o ligera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden prepararse usando la tecnología VELOCIMMUNE™. Usando la tecnología VELOCIMMUNE™ (o cualquier otra tecnología de generación de anticuerpos humanos), se aíslan inicialmente anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra un antígeno particular (por ejemplo, CD3 o CD20) que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y seleccionan en cuanto a características convenientes, entre ellas la afinidad, la selectividad, el epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan por una región constante humana deseada para generar cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas que se pueden incorporar en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas.

Se pueden usar animales genéticamente modificados para fabricar moléculas de unión a antígeno biespecíficas humanas. Por ejemplo, se puede usar un ratón genéticamente modificado que sea incapaz de reorganizar y expresar una secuencia variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón, en donde el ratón expresa solo uno o dos dominios variables de la cadena ligera humana codificados por secuencias de inmunoglobulina humana unidas operativamente al gen constante kappa de ratón en el locus kappa de ratón endógeno. Dichos ratones genéticamente modificados pueden usarse para producir moléculas de unión a antígeno biespecíficas completamente humanas que comprenden dos cadenas pesadas distintas que se asocian con una cadena ligera idéntica que comprende un dominio variable procedente de uno de dos segmentos génicos de región variable de la cadena ligera humana distintos. (Véase, por ejemplo, el documento US 2011/0195454 para un análisis detallado sobre tales ratones diseñados técnicamente y el uso de los mismos para producir moléculas de unión a antígeno biespecíficas).

### Bioequivalentes

La presente divulgación abarca moléculas de unión a antígeno que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de las moléculas ejemplares divulgadas en el presente documento pero que retienen la capacidad de unirse a CD3 y/o a CD20. Dichas moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, cuando se comparan con la secuencia parental, pero presentan una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno que son bioequivalentes a cualquiera de las moléculas de unión a antígeno ejemplares expuestas en el presente documento. Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, en una única dosis o en múltiples dosis. Algunas proteínas de unión a antígeno se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su tasa de absorción, y aún pueden considerarse bioequivalentes debido a que tales diferencias en la tasa de absorción son intencionadas y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para alcanzar las concentraciones eficaces del fármaco en el organismo en, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran sin importancia desde el punto de vista médico para el producto farmacológico particular estudiado.

En un caso, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente importantes en su seguridad, pureza y potencia.

En un caso, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio significativo desde el punto de vista clínico en la inmunogenicidad, o una eficacia disminuida, en comparación con la terapia continuada sin tal cambio.

En un caso, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos comunes de acción para la afección o afecciones de uso, en la medida en que tales mecanismos sean conocidos.

La bioequivalencia puede demostrarse por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en los que se mide la concentración del anticuerpo o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro líquido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado con y es razonablemente predictiva de datos de biodisponibilidad *in vivo* en seres humanos; (c) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en la que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establezca la seguridad, la eficacia, o la biodisponibilidad o bioequivalencia de una proteína de unión a antígeno.

Las variantes bioequivalentes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas ejemplares expuestas en el presente documento pueden construirse mediante, por ejemplo, la fabricación de diversas sustituciones de restos o secuencias, o la deleción de restos o secuencias terminales o internos, no necesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, pueden deleccionarse o reemplazarse por otros aminoácidos restos de cisteína no esenciales para la actividad biológica, para impedir la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, las proteínas de unión a antígeno bioequivalentes pueden incluir variantes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas ejemplares expuestas en el presente documento que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glucosilación de las moléculas, por ejemplo, mutaciones que eliminan o retiran la glucosilación.

#### **Selectividad de especie y reactividad cruzada de especie**

De acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, el anticuerpo biespecífico se une a CD3 humano, pero no a CD3 de otras especies. De acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, el anticuerpo biespecífico se une a CD20 humano, pero no a CD20 de otras especies. De acuerdo con determinadas realizaciones de la invención, el anticuerpo biespecífico se une a CD3 humano y a CD3 de una o más especies no humanas; y/o se une a CD20 humano y a CD20 de una o más especies no humanas.

De acuerdo con determinadas realizaciones ejemplares de la divulgación, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que se unen a CD3 humano y/o CD20 humano, y pueden unirse o no unirse, según el caso, a uno o más CD3 y/o CD20 de ratón, rata, cobaya, hámster, jerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, cinomolgo, tití, rhesus o chimpancé. Por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden comprender un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano y CD3 de cinomolgo, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 humano.

#### **Inmunconjugados**

Los anticuerpos biespecíficos para uso en la presente invención pueden conjugarse con una fracción terapéutica ("inmunconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunodepresor o un radioisótopo.

Los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. En la técnica se conocen ejemplos de agentes citotóxicos y agentes quimioterapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados, (véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081).

## 5 Formulación terapéutica y administración

Como se usa en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad del agente activo terapéutico suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos, tales como toxicidad, irritación o una respuesta alérgica. La "cantidad eficaz" específica, obviamente, variará con factores tales como la afección particular que se está tratando, el estado físico del paciente, el tipo de animal a tratar, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea (si existe), y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados. En este caso, una cantidad se consideraría terapéuticamente eficaz si resultara en uno o más de, pero sin limitación, los siguientes: (a) la inhibición del crecimiento tumoral (por ejemplo, cáncer de linfocitos B); y (b) la inversión o estabilización de un cáncer de linfocitos B.

La dosis de molécula de unión a antígeno administrada a un paciente puede variar dependiendo de la edad y las dimensiones del paciente, la enfermedad diana, las afecciones, la vía de administración y similares. La dosis preferente se calcula normalmente de acuerdo con el peso corporal o la superficie corporal. Cuando una molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente invención se usa con fines terapéuticos en un paciente adulto, puede ser ventajoso administrar por vía intravenosa la molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente invención, normalmente en una única dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, pueden ajustarse la frecuencia y la duración del tratamiento. Las dosificaciones eficaces y posologías para administrar una molécula de unión a antígeno biespecífica pueden determinarse empíricamente; por ejemplo, puede controlarse el progreso del paciente mediante una evaluación periódica, y ajustarse la dosis en consecuencia. Además, pueden realizarse cambios entre especies de las dosificaciones usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Se conocen y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica diversos sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección embolada, por absorción a través de la mucosa epitelial o mucocutánea (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

Una composición farmacéutica puede suministrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa convencionales. Además, con respecto al suministro subcutáneo, un dispositivo de administración de pluma preparado tiene aplicaciones en el suministro de una composición farmacéutica. Dicho dispositivo de suministro de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de suministro de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y remplazarse por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de suministro de pluma entonces puede reutilizarse. En un dispositivo de suministro de pluma desechable, no hay un cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de suministro de pluma desechable viene prellenado, con la composición farmacéutica contenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se desecha el dispositivo completo.

Numerosos dispositivos de suministro de pluma y autoinyector reutilizables tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMA-LOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), pluma de BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de suministro de pluma desechables que tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica incluyen, pero sin limitación, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.), y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), por nombrar solo algunos.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, CRC

Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos; véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En otra realización más, puede colocarse en las proximidades de la diana de la composición un sistema de liberación controlada, precisándose, por lo tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en *Medical Applications of Controlled Release*, citada anteriormente, vol. 2, pág. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas farmacéuticas para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones intravenosas, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos públicamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descrito anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente usado para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, la solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que puede usarse en combinación con un agente de solubilización apropiado, tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio aceitoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., los cuales pueden usarse en combinación con un agente de solubilización tal como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección así preparada se rellena preferentemente en una ampolla apropiada.

De manera ventajosa, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenida generalmente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, es preferente que el anticuerpo mencionado anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas farmacéuticas.

### Usos terapéuticos de las moléculas de unión a antígeno

La presente divulgación incluye métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-CD3 o una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une específicamente a CD3 y a un antígeno diana (por ejemplo, CD20). La composición terapéutica puede comprender cualquiera de los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficos como se divulga en el presente documento y un transportador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "un sujeto que lo necesite" se refiere a un animal humano o no humano que presente uno o más síntomas o indicios de cáncer (por ejemplo, un sujeto que expresa un tumor o padece cualquiera de los cánceres mencionados a continuación), o que, de otra manera, se beneficiaría de una inhibición o reducción de la actividad de CD20 o de un empobrecimiento de linfocitos B CD20+ o una regresión de tumores de linfocitos B CD20+.

Los anticuerpos y las moléculas de unión a antígeno biespecíficos de la divulgación (y las composiciones terapéuticas que los comprenden) son útiles, entre otros, para tratar cualquier enfermedad o trastorno en el que la estimulación, la activación y/o el direccionamiento de una respuesta inmunitaria serían beneficiosos. En particular, las moléculas de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la presente divulgación pueden usarse para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado o mediado por la expresión o actividad de CD20, o la proliferación de linfocitos B CD20+. El mecanismo de acción mediante el cual se logran los métodos terapéuticos de la divulgación incluye la destrucción de las células que expresan CD20 en presencia de células efectoras, por ejemplo, por apoptosis, fagocitosis, o por una combinación de dos o más de estos mecanismos, o mecanismos citotóxicos similares. Las células que expresan CD20 que pueden inhibirse o destruirse usando las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la divulgación incluyen, por ejemplo, linfocitos B oncógenos.

La reducción de la carga tumoral o la regresión tumoral incluye la desaparición parcial o completa de un tumor o tumores en un sujeto. Se entiende que la regresión tumoral representa una tendencia hacia una menor carga tumoral o un estado de enfermedad menos grave. Como tal, la regresión es una eliminación y disminución progresiva de neoplasias malignas medibles en el cuerpo, incluyendo disminución del tamaño del tumor y/o disminución del número de tumores. La reducción del desarrollo tumoral incluye una inhibición o supresión parcial o completa del crecimiento tumoral adicional o nuevo.

Las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación pueden usarse para dirigirse a y tratar, por ejemplo, tumores primarios y/o metastásicos que surgen en el cerebro y las meninges, orofaringe, pulmón y árbol bronquial, tracto gastrointestinal, aparato reproductor masculino y femenino, músculo, hueso, piel y anejos cutáneos, tejido conjuntivo, bazo, sistema inmunitario, células hematopoyéticas y médula ósea, hígado y vías urinarias, y órganos sensoriales especiales tales como el ojo. En determinados casos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la divulgación se usan para tratar uno o más de los siguientes cánceres: carcinoma de células renales, carcinoma pancreático, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, gliomas malignos, osteosarcoma, cáncer

5 colorrectal, cáncer gástrico (por ejemplo, cáncer gástrico con amplificación de MET), mesotelioma maligno, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer microcítico de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, sarcoma sinovial, cáncer de tiroides o melanoma. En la invención, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento o la mejora de un cáncer de linfocitos B en un sujeto (por ejemplo, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia/linfoma linfoblástico de linfocitos B precursores, neoplasias de linfocitos B maduros, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B/linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma cutáneo del centro folicular, linfoma de linfocitos B de zonas marginales, leucemia de tricolecocitos, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfoma anaplásico de células grandes).

15 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 pueden administrarse en una cantidad suficiente para reducir la carga tumoral, producir regresión tumoral, inhibir el crecimiento tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto. La cantidad administrada puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. La cantidad administrada puede ser de aproximadamente 0,4 mg/kg. La cantidad administrada puede ser de aproximadamente 0,04 mg/kg. La cantidad administrada puede ser de aproximadamente 0,004 mg/kg.

20 De acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención, el paciente padece un linfoma de linfocitos B (por ejemplo, LNH) que es resistente, o no es completamente reactivo a la terapia anti-CD20 sola (por ejemplo, resistente a la terapia con rituximab). De acuerdo con otras realizaciones relacionadas de la invención, el paciente padece un linfoma de linfocitos B (por ejemplo, LNH) que es insensible a la terapia anti-CD20 (por ejemplo, un paciente con un tumor insensible a rituximab o con linfoma de linfocitos B recidivante o insensible). Los métodos analíticos/de diagnóstico conocidos en la técnica, tal como la exploración tumoral, etc., pueden usarse para determinar si un paciente alberga un tumor resistente, que no es completamente reactivo o es insensible al tratamiento anti-CD20 solo.

25 La presente divulgación también incluye métodos para el tratamiento del cáncer residual en un sujeto. Como se usa en el presente documento, la expresión "cáncer residual" significa la existencia o persistencia de una o más células cancerosas en un sujeto después del tratamiento con una terapia contra el cáncer.

30 De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de CD20 (por ejemplo, linfoma de linfocitos B) que comprende administrar una o más de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas, descritas en otra parte en el presente documento, a un sujeto después de que el sujeto haya recibido monoterapia con anti-CD20 (por ejemplo, después de la administración de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD20 tal como rituximab). Por ejemplo, la presente divulgación incluye métodos para tratar un linfoma de linfocitos B que comprende administrar una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 a un paciente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 1 año o más después de que el sujeto haya recibido monoterapia anti-CD20 (por ejemplo, un tratamiento con rituximab o un tratamiento equivalente al mismo).

40

### Terapias combinadas y formulaciones

45 La presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos ejemplares y moléculas de unión a antígeno biespecíficos descritos en el presente documento, en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que pueden combinarse o administrarse en combinación con una molécula de unión a antígeno de la presente invención incluyen, por ejemplo, un antagonista de EGFR (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR [por ejemplo, cetuximab o panitumumab] o un inhibidor de molécula pequeña de EGFR [por ejemplo, gefitinib o erlotinib]), un antagonista de otro miembro de la familia EGFR, tal como Her2/ErbB2, ErbB3 o ErbB4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-ErbB2, anti-ErbB3 o anti-ErbB4 o un inhibidor de molécula pequeña de la actividad de ErbB2, ErbB3 o ErbB4), un antagonista de EGFRvIII (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a EGFRvIII), un anagonista de cMET (por ejemplo, un anticuerpo anti-cMET), un antagonista de IGF1R (por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF1R), un inhibidor de B-raf (por ejemplo, vemurafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX-4720), un inhibidor de PDGFR- $\alpha$  (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR- $\alpha$ ), un inhibidor de PDGFR- $\beta$  (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR- $\beta$ ), un antagonista de VEGF (por ejemplo, un VEGF-Trap, véase, por ejemplo, el documento US 7.087.411 (también denominado en el presente documento "proteína de fusión inhibidora de VEGF"), un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab), un inhibidor de quinasa de molécula pequeña del receptor de VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib o pazopanib)), un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-DLL4 divulgado en el documento US 2009/0142354), un antagonista de Ang2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ang2 divulgado en el documento US 2011/0027286, tal como H1H685P), un antagonista de FOLH1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-FOLH1), un antagonista de PRLR (por ejemplo, un anticuerpo anti-PRLR), un antagonista de STEAP1 o STEAP2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-STEAP1 o un anticuerpo anti-STEAP2), un antagonista de Tmprss2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Tmprss2), un antagonista de MSLN (por ejemplo, un anticuerpo anti-MSLN), un antagonista de CA9 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CA9), un antagonista de uroplaquina (por ejemplo, un anticuerpo anti-uroplaquina), un anticuerpo anti-CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab (MDX-010)), un antagonista monovalente de CD20 (por ejemplo, un anticuerpo monovalente anti-CD20, tal como rituximab), etc.

65

- Otros agentes que pueden administrarse de forma beneficiosa en combinación con las moléculas de unión a antígeno de la invención incluyen activadores o inhibidores inmunitarios. Determinados activadores o inhibidores inmunitarios son activadores o inhibidores de citocinas, entre ellos compuestos de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 o a sus receptores respectivos. Las composiciones farmacéuticas (por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 como se divulga en el presente documento) también se pueden administrar como parte de un régimen terapéutico que comprende una o más combinaciones terapéuticas seleccionadas de "ICE": ifosfamida (por ejemplo, Ifex®), carboplatino (por ejemplo, Paraplatin®), etopósido (por ejemplo, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": dexametasona (por ejemplo, Decadron®), citarabina (por ejemplo, Cytosar-U®, arabinósido de citosina, ara-C), cisplatino (por ejemplo, Platinol®-AQ); y "ESHAP": etopósido (por ejemplo, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), metilprednisolona (por ejemplo, Medrol®), dosis altas de citarabina, cisplatino (por ejemplo, Platinol®-AQ).
- La presente invención también incluye combinaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo biespecífico de la invención y un inhibidor de uno o más de VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroplaquina o cualquiera de las citocinas mencionadas anteriormente, en donde el inhibidor es un aptámero, una molécula antisentido, una ribozima, una ARNip, un peptidocuerpo, un nanocuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab; fragmento F(ab')<sub>2</sub>; fragmento Fd; fragmento Fv; scFv; fragmento dAb; u otras moléculas diseñadas técnicamente, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimas). Las moléculas de unión a antígeno de la invención también pueden administrarse y/o formularse conjuntamente en combinación con antivíricos, antibióticos, analgésicos, corticosteroides y/o AINE. Las moléculas de unión a antígeno de la invención también pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento que también incluye tratamiento por radiación y/o quimioterapia convencional.

El componente (o componentes) terapéuticamente activo adicional puede administrarse antes de, de forma simultánea o poco después de la administración de una molécula de unión a antígeno de la presente invención (para los fines de la presente divulgación, tales regímenes de administración se consideran la administración de una molécula de unión a antígeno "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional).

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo biespecífico de la presente invención se formula conjuntamente con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte en el presente documento.

### Regímenes de administración

De acuerdo con determinados casos, se pueden administrar múltiples dosis de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 o una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une específicamente a CD20 y CD3) a un sujeto durante un curso de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de una molécula de unión a antígeno. Como se usa en el presente documento, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de una molécula de unión a antígeno se administra al sujeto en un distinto punto temporal, por ejemplo, en distintos días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente divulgación incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una única dosis inicial de una molécula de unión a antígeno, seguido de una o más dosis secundarias de la molécula de unión a antígeno, y opcionalmente seguido de una o más dosis terciarias de la molécula de unión a antígeno.

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias", y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia temporal de administración de la molécula de unión a antígeno. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al inicio del régimen de tratamiento (también denominada "dosis basal"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener todas la misma cantidad de molécula de unión a antígeno, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. En determinados casos, sin embargo, la cantidad de una molécula de unión a antígeno contenida en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varía entre sí (por ejemplo, ajustadas al alza o a la baja según sea apropiado) durante el curso de tratamiento. En determinados casos, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dosis se administran al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga", seguido de dosis posteriores que se administran con menos frecuencia (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

En un caso ejemplar, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra de 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "la dosis inmediatamente anterior", como se usa en el presente documento, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de molécula de unión a antígeno que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la divulgación pueden comprender administrar a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une específicamente a CD20 y CD3). Por ejemplo, en determinados casos, se administra al paciente únicamente una sola dosis secundaria. En otros casos, se administran al paciente dos o más dosis secundarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más). Asimismo, en determinados casos, se administra al paciente únicamente una sola dosis terciaria. En otros casos, se administran al paciente dos o más dosis terciarias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más).

En los casos que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente de 1 a 2 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. De manera similar, en los casos que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede administrarse al paciente de 2 a 4 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. Como alternativa, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar en el curso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ajustarse durante el curso de tratamiento por parte de un médico, dependiendo de las necesidades del paciente individual después de examen clínico.

## 20 Usos de diagnóstico de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-CD3xCD20 de la presente divulgación también se pueden usar para detectar y/o medir CD3, o células que expresan CD3 en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3xCD20, o fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión anómala (por ejemplo, sobreexpresión, subexpresión, ausencia de expresión, etc.) de CD3. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para CD3 pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-CD3xCD20 de la divulgación, en donde el anticuerpo está marcado con un marcador detectable o molécula indicadora. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo anti-CD3xCD20 no marcado en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está de por sí marcado de forma detectable. El marcador detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{125}\text{I}$ ; una fracción fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como una fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ensayos ejemplares específicos que pueden usarse para detectar o medir CD3 en una muestra incluyen ensayo de inmunoadsorción asociado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Los anticuerpos anti-CD3xCD20 de la presente divulgación también se pueden usar para detectar y/o medir CD20, o células que expresan CD20 en una muestra, o para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión anómala (por ejemplo, sobreexpresión, subexpresión, ausencia de expresión, etc.) de CD20, de manera análoga.

Las muestras que pueden usarse en ensayos de diagnóstico de CD3 o CD20 de acuerdo con la presente divulgación incluyen cualquier tejido o muestra de líquido que se puede obtener de un paciente que contiene cantidades detectables de proteína CD3 y/o CD20, o fragmentos de las mismas, en condiciones normales o patológicas. En general, se medirán los niveles de CD3 o CD20 en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no afectado por una enfermedad o afección asociada con niveles o una actividad de CD3 o CD20 anómalos) para establecer inicialmente un nivel basal, o patrón de CD3 o CD20. Después, este nivel basal de CD3 o CD20 se puede comparar con los niveles de CD3 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una enfermedad o afección relacionada con CD3 o CD20, respectivamente.

## 50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se ha intentado garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, las cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o próxima a ella.

### 60 Ejemplo 1. Generación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD20

Se conocen varios métodos para aislar anticuerpos anti-CD3 o anti-CD20. Los anticuerpos anti-CD3 completamente humanos utilizados en los siguientes ejemplos se aislaron directamente de linfocitos B positivos para el antígeno sin fusión con células de mieloma, como se describe en el documento US 2007/0280945A1.

En los métodos se pueden usar ejemplos adicionales de anticuerpos anti-CD3, y la descripción de tales anticuerpos y

las propiedades biológicas de tales anticuerpos anti-CD3 se describen en la solicitud internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre de 2013 y publicada como documento WO2014047231. Los anticuerpos anti-CD20 ejemplares y las propiedades biológicas de tales anticuerpos anti-CD20 se describen en el documento US 7.879.984 y la solicitud internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre de 2013 y publicada como documento WO2014047231.

El anticuerpo anti-CD20 y su método de fabricación del anticuerpo utilizado para construir los anticuerpos biespecíficos de este ejemplo es como se describe en el documento US 7.879.984.

Los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y las CDR usadas para construir el brazo de unión a antígeno anti-CD3 y el brazo de unión anti-CD20 de los anticuerpos biespecíficos de la invención se exponen en la Tabla 1. Los correspondientes identificadores de secuencia de ácido nucleico se exponen en la Tabla 2.

**Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos (los SEQ ID NO)**

Designación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Anti-CD20	2	4	6	8	18	20	22	24
Anti-CD3	10	12	14	16	18	20	22	24

**Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácido nucleico (los SEQ ID NO)**

Designación del anticuerpo	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Anti-CD20	1	3	5	7	17	19	21	23
Anti-CD3	9	11	13	15	17	19	21	23

**Ejemplo 2. Generación de anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 y CD20**

Los anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio de unión específico anti-CD3 y un dominio de unión específico anti-CD20 se construyeron con las secuencias anteriores usando metodologías convencionales en donde una cadena pesada y una cadena ligera afín de un anticuerpo anti-CD3 se combinaron con una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD20.

Como tal, los anticuerpos biespecíficos creados en conformidad con el presente Ejemplo comprenden dos dominios de unión a antígeno separados (es decir, brazos de unión). El primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada procedente de un anticuerpo anti-CD20 ("CD20-VH"), emparejada con una región variable de la cadena ligera procedente de un anticuerpo anti-CD3 ("CD3-VL"). El emparejamiento CD20-VH/CD3-VL crea un dominio de unión a antígeno que reconoce específicamente a CD20. El segundo dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada procedente de un anticuerpo anti-CD3 ("CD3-VH"), emparejada con una región variable de la cadena ligera procedente de un anticuerpo anti-CD3 ("CD3-VL"). El emparejamiento CD3-VH/CD3-VL crea un dominio de unión a antígeno que reconoce específicamente a CD3. Se usó el mismo CD20-VH en todos los anticuerpos biespecíficos creados en este ejemplo y se designa "CD20-VH-A".

El dominio constante de la cadena pesada (CH) de tipo silvestre para cada cadena pesada se reemplazó por un CH quimérico mediante técnicas recombinantes. El CH de un brazo de unión (por ejemplo, el brazo de unión anti-CD3) contiene una mutación en la región CH3 de la CH que facilita el aislamiento del biespecífico.

Un resumen de las partes componentes de los diversos anticuerpos biespecíficos fabricados en conformidad con este Ejemplo se expone en la Tabla 3 y la Tabla 4.

**Tabla 3: Identificadores de secuencia de aminoácidos**

Nombre de anticuerpo biespecífico	Dominio de unión a antígeno anti-CD20			Dominio de unión a antígeno anti-CD3		
	Región variable de la cadena pesada	Región constante de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera	Región variable de la cadena pesada	Región constante de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
Anticuerpo 1	2	26	18	10	28	18
Anticuerpo 2	2	30	18	10	32	18

**Tabla 4: Identificadores de secuencia de ácido nucleico**

Nombre de anticuerpo biespecífico	Dominio de unión a antígeno anti-CD20			Dominio de unión a antígeno anti-CD3		
	Región variable de la cadena pesada	Región constante de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera	Región variable de la cadena pesada	Región constante de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
Anticuerpo 1	1	25	17	9	27	17
Anticuerpo 2	1	29	17	9	31	17

5 Las Tablas 5 y 6 exponen los identificadores de secuencia de aminoácidos para las diversas regiones variables de la cadena pesada (Tabla 5) y las regiones variables de la cadena ligera (Tabla 6) con sus correspondientes CDR de los anticuerpos biespecíficos de este Ejemplo.

**Tabla 5: Identificadores de secuencia de aminoácido de la cadena pesada**

Identificador de cadena pesada	Región variable de la cadena pesada (HCVR)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Región constante de la cadena pesada (CH)
CD20-VH-CH-A	2	4	6	8	26 o 28, o 30 o 32
CD3-VH-CH-A	10	12	14	16	

10

**Tabla 6: Identificadores de secuencia de aminoácido de la cadena ligera**

Identificador de cadena ligera	Región variable de la cadena ligera (LCVR)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	18	20	22	24

15 Además, Las tablas 7 y 8 exponen los identificadores de secuencia para las secuencias de nucleótidos que codifican las diversas regiones variables de la cadena pesada (Tabla 7), regiones constantes de la cadena pesada y regiones variables de la cadena ligera (Tabla 8) con sus correspondientes CDR de los anticuerpos biespecíficos de este Ejemplo.

20

**Tabla 7: Identificadores de secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada**

Identificador de cadena pesada	Región variable de la cadena pesada (HCVR)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Región constante de la cadena pesada (HCVR)
CD20-VH-A	1	3	5	7	25 o 27, o 29 o 31
CD3-VH-A	9	11	13	15	

**Tabla 8: Identificadores de secuencias de ácido nucleico de la cadena ligera**

Identificador de cadena ligera	Región variable de la cadena ligera (LCVR)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	17	19	21	23

25 Además de los anticuerpos biespecíficos descritos anteriormente, también se utilizaron en determinados experimentos expuestos en los Ejemplos que siguen los siguientes anticuerpos de control:

30 Anticuerpo 1 de control: Anticuerpo monoclonal "OKT-3" contra antígenos de superficie de linfocitos T humanos como se expone en el documento US 4.361.549 y disponible del hibridoma CRL-8001 (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Anticuerpo 2 de control: El anticuerpo "SP34" reactivo contra la cadena épsilon del complejo T3 en linfocitos T humanos, disponible de BD Pharmagen, n.º de cat. 55052.

Anticuerpo 3 de control: Anticuerpo terapéutico anti-CD20, con secuencias de las cadenas pesada y ligera de Rituxan® (Rituximab) como se divulga en el documento US 5.736.137.

35 Anticuerpo 4 de control: También conocido como anticuerpo CD3xCD20-Fc de tipo silvestre (Fcts), este anticuerpo se fabricó de manera análoga a los métodos anteriores, teniendo un brazo anti-CD20 que comprende una pareja de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 2/18 (secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 de las SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24), y una región CH de IgG1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 45); y un brazo anti-CD3 que comprende una pareja de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 10/18 (secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 de las SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24), y una región CH de tipo silvestre con 2 modificaciones de aminoácidos (SEQ ID NO: 48) en el dominio CH3, para facilitar el aislamiento. El anticuerpo CD3xCD20-Fcts (Anticuerpo 4) puede denominarse un anticuerpo de control coincidente que tiene un dominio Fc de IgG 1 de tipo

40

silvestre (es decir coincidente con los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos CD3xCD20-Fc quimérico de la invención), con el fin de comparar las funciones efectoras de los anticuerpos u otras propiedades, con los anticuerpos que tienen distintas secuencias de dominio Fc o estructura.

Anticuerpo 5 de control: El anticuerpo monoclonal anti-FeID1 se une a un antígeno de felino sin reactividad cruzada con CD20 o CD3 humano. Este control de anticuerpo no específico de IgG 1 se obtuvo por métodos descritos en la publicación PCT N.º WO2013/166236, publicada el 7 de noviembre de 2013.

Anticuerpo 6 de control: El dominio de unión a antígeno anti-FeID1, como se describe en la publicación PCT N.º WO2013/166236, se diseñó técnicamente como se describe en el presente documento para contener un dominio Fc de IgG4 quimérico, análogamente al Ac 1. El Ac 6 de control no tiene reactividad cruzada con CD20 o CD3 humano, pero tiene una función efectora similar al Ac 1.

### Ejemplo 3. Construcción de la cadena pesada quimérica

La generación de las pesadas cadenas quiméricas, por ejemplo, CH de IgG4 quimérico (SEQ ID NO: 26) y un CH de IgG 1 quimérico (SEQ ID NO: 30), se realizó utilizando técnicas de clonación convencionales. En primer lugar, la CH de IgG4 quimérica se generó a través de un procedimiento de amplificación por PCR de dos etapas. Se amplificaron dos fragmentos de PCR, el Fragmento 1 y el 2, usando una construcción de vector de partida pR001 que contenía un ADN de CH de hIgG4 de tipo silvestre, usando parejas de cebadores que flanquean la región CH, P1-P2 y P3-P4, respectivamente. Véase la Tabla 9 a continuación). Los cebadores introdujeron en los fragmentos tanto la secuencia deseada de la bisagra inferior de IgG2 (que codifica la SEQ ID NO: 52) como los sitios de restricción flanqueantes. Después, estos dos fragmentos se unieron usando los cebadores de PCR P2 y P4. La secuencia resultante se insertó en pR001 a través de los sitios de restricción Xho1-Not1, generando una construcción de vector pR002 que contiene un CH de IgG4 quimérico que tiene una secuencia de bisagra inferior de IgG2. La secuencia se confirmó usando los cebadores P10 y P11.

Además, el CH de IgG1 quimérico se generó a través de una amplificación por PCR de múltiples etapas. El fragmento 1a se generó usando los cebadores P2 y P5 (véase la Tabla 9 a continuación) a partir del molde pR85503 (que contiene un ADN de CH de IgG1 humana de tipo silvestre). El fragmento 2a se amplificó con los cebadores P6 y P8 usando pR002 (que contiene el ADN de CH de IgG4 quimérico) como molde. El fragmento 3 se fabricó usando los cebadores P7 y P9 a partir de la plantilla pR003 (ADN de CH de hIgG1 de tipo silvestre; SEQ ID NO: 45). Los fragmentos 1a y 2a se unieron usando los cebadores P2 y P8, lo que generó el Fragmento 4. La unión de los Fragmentos 2a y 3 usando los cebadores P6 y P9 creó el Fragmento 5. Después, los Fragmentos 4 y 5 se fusionaron usando los cebadores P2 y P9. La secuencia resultante se insertó en pR001 a través de los sitios de restricción Xho1-Not1, generando una construcción pR004 que tiene una región constante de IgG 1 con la bisagra inferior de IgG2 y el dominio CH2 de IgG4. La secuencia se confirmó usando los cebadores P10 y P11.

**Tabla 9: Cebadores para la generación por PCR de construcciones de ácido nucleico de C<sub>H</sub> quimérico**

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (SEQ ID NO)
P1	5'-TTCGCGCAGCTTAGGTTTATGCCAGGGGGACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGGACACCGT -3' (antisentido) (SEQ ID NO: 63)
P2	5'-AAGCTTATACTCGAGCTCTAGATTGGGAACCCGGGTCTCT-3' (SEQ ID NO: 64)
P3	5'-CCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAA-3' (SEQ ID NO: 65)
P4	5'-TGTGTCTTCAGGGAGAGGGACAGAGACCCATTTACTCGCC GGCG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 66)
P5	5'-CTCGGGTTTAGAACACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGGACACCGT-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 67)
P6	5'-AAATCTTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCACTGTG-3' (SEQ ID NO: 68)
P7	5'-GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC-3' (SEQ ID NO: 69)
P8	5'-CTCTTTTGGTAGAGTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTG GTGTCCACATGTGG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 70)
P9	5'-CTTCAGGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCCGGCG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 71)
P10	5'-GCTGACAGACTAACAGACTG-3' (SEQ ID NO: 72)
P11	5'-ATACATTATACGAAGTTATACCGGTA-3' (SEQ ID NO: 73)

**Ejemplo 4. Los anticuerpos biespecíficos CD20 x CD3 se unen selectivamente a linfocitos T Jurkat, Raji y de mono en comparación con los anticuerpos monoespecíficos**

El anticuerpo CD3xCD20-Fc<sub>s</sub> (anticuerpo de control 4) se comparó con los anticuerpos de control monoespecíficos, como se expone en el Ejemplo 2, a través de un método de unión de FACS en cuanto a su capacidad de unirse a Jurkat (la línea de linfocitos T CD3+, CD20 - humanos), Raji (línea de linfocitos B CD3-, CD20+ humanos) o CMSP de cinomolgo ("linfocitos mKT").

Los datos de FACS se obtuvieron utilizando el siguiente protocolo: Se incubaron 2x10<sup>5</sup> células por pocillo con los anticuerpos diluidos en serie durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, se lavaron las células y se añadieron los anticuerpos secundarios apropiados (células Jurkat, RAJI) o un cóctel de anticuerpos secundarios (para las CMSP de cinomolgo), y se incubaron durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS frío que contenía BSA al 1 % y se analizaron por citometría de flujo en un BD FACS Canto II. Las células Jurkat y Raji se seleccionaron por dispersiones lateral y directa, mientras que los linfocitos T de cinomolgo también se seleccionaron como una población CD2+ CD4+. Las CE<sub>50</sub> para la titulación de la unión a células se determinaron usando el programa informático Prism con valores calculados usando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Valores de CE<sub>50</sub> (molar) para la unión para los anticuerpos monoespecíficos frente a los biespecíficos CD3xCD20**

Anticuerpo	FACS - Jurkat	FACS - RAJI	FACS - linfocitos mKT
Control 1 (anti-CD3)	1,96E-10	SU	SU
Control 2 (anti-CD3)	(+)	SU	7,03E-11
Control 3 (anti-CD20)	Sin unión	(+)	SU
Control 4 (anti-CD3xCD20, CH de tipo silvestre)	3,85E-08	5,99E-08	8,74E-06
(+) valores de CE <sub>50</sub> no determinados, pero se observó unión; SU = sin unión; NP no probado			

Como se muestra en la Tabla 10, el panel de anticuerpos probados mostró un intervalo de afinidades de unión en las diversas líneas celulares, dependiendo de sus especificidades. El Anticuerpo 4 biespecífico de control mostró la capacidad de unirse a ambas líneas diana humanas y de cinomolgo. El Anticuerpo 4 de control comprende las mismas regiones variables anti-CD3xCD20 que el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 2 de la invención, sin embargo, tiene una región CH de IgG1 de tipo silvestre. El de control 1 anti-CD3 (OKT3), el de control 2 anti-CD3 (SP34) y el de control 3 anti-CD20 se unieron a Jurkat, a linfocitos T de cinomolgo y a RAJI, respectivamente.

**Ejemplo 5. Los anticuerpos biespecíficos CD20 x CD3 con CH de tipo silvestre inducen citotoxicidad para las células Raji en presencia de los linfocitos T activados**

La capacidad de los anticuerpos biespecíficos CD20 x CD3 para redirigir la destrucción mediada por linfocitos T a células Raji que expresan CD20 se analizó en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Además, también se estudió la capacidad de los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos y parentales para destruir células U937 a través de interacciones

Fc/FcR.

Se llevaron a cabo ensayos de destrucción de calceína utilizando el siguiente protocolo: Se aislaron CMSP humanas y de cinomolgo sobre ficoll-Plaques o a través de medios de separación de células Lympholyte Mammal, respectivamente. Las CMSP aisladas se activaron durante un ciclo de varios días con medios que contenían IL-2 humana recombinante (30 U/ml) y perlas de activación de linfocitos T (anti-CD3/CD28 para CMSP humanas, anti-CD2/CD3/CD28 para CMSP de cinomolgo).

Las células diana (Raji para la destrucción celular mediada por CD20 y U937 para la destrucción mediada por FcR) se marcaron con calceína, y se incubaron con los linfocitos activados en una relación efector:diana de 10:1, utilizando diluciones en serie con factor 3 de los anticuerpos en un ciclo de 3 horas a 37 °C. Después de la incubación, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a una placa negra translúcida de fondo transparente para el análisis de fluorescencia. Las CE<sub>50</sub> definidas como la concentración molar de anticuerpo biespecífico que induce una citotoxicidad del 50 % se determinaron usando Prism. Los valores se calcularon utilizando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

**Tabla 11. Valores de CE<sub>50</sub> para la citotoxicidad inducida por CD20 x CD3 para células Raji y U937**

Anticuerpo	Citotoxicidad de linfocitos T humanos para Raji [M]	Citotoxicidad de linfocitos T de mono para Raji [M]	Citotoxicidad de linfocitos T humanos para U937 [M]
Ac 1 de control (anti-CD3)	SA	SA	3.04E-12
Ac 4 de control (anti-CD3xCD20)	5,63E-11*	1,27E-12*	8,86E-11*
(*) Los datos son valores medios de 3 o más ensayos independientes. Los datos sin un (*) son valores representativos/promedio de 1 o 2 ensayos independientes. SA = Sin actividad			

Como se muestra en la Tabla 11, el anticuerpo biespecífico CD20 x CD3 que contiene brazos anti-CD3 específicos para ser humano y con reacción cruzada con cinomolgo, y una región CH de IgG1 de tipo silvestre, tuvo la capacidad de redirigir de forma específica la citotoxicidad a las células Raji en presencia de los linfocitos T humanos activados. En presencia de los linfocitos T de cinomolgo activados, las Raji se destruyeron cuando se incubaron con el anticuerpo biespecífico de control Ac 4, que tiene un brazo anti-CD3 que activa los linfocitos T de mono. Tanto el anticuerpo biespecífico como el Ac 1 de control (AcM anti-CD3) mostraron actividad en el ensayo de destrucción dependiente de Fc/FcR de U937. Esta actividad pudo bloquearse mediante la adición a la reacción de IgG humana bloqueante no específica (datos no mostrados).

**Ejemplo 6. Los anticuerpos biespecíficos CD20 x CD3 que comprenden regiones CH quiméricas muestran una función efectora disminuida en un ensayo de CDC**

Los anticuerpos biespecíficos CD20xCD3 con regiones CH quiméricas (Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2), como se describe anteriormente en el Ejemplo 2, se diseñaron para alterar o reducir la función efectora. En comparación con los anticuerpos que comprenden una región constante de cadena pesada de tipo silvestre (ts) del isotipo IgG1 (Ac 4 de control), las sustituciones de aminoácidos en la región CH pueden dificultar la capacidad de un Fc de Ig para unirse a su receptor (o receptores). Por tanto, la señalización y las respuestas inmunitarias, tal como la activación de linfocitos B o la fagocitosis, se puede alterar. Se examinó el efecto de las modificaciones de aminoácidos en la región CH sobre la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (en este ejemplo) y la función efectora de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase el Ejemplo 7).

Para examinar el efecto del Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 2 sobre la función efectora de la CDC, se sembraron en placas células Raji (diana) (5000/pocillo) o las células Daudi, que expresan CD20, en presencia de un de complemento de suero humano al 5 %. Se añadieron a las células diluciones seriadas del Anticuerpo 1, el Anticuerpo 2 y de los anticuerpos de control, a partir de 100 nM, durante 4 h a 37 °C. La lisis de las células diana se determinó usando el kit CytoTox Glo™ (Promega) y se calculó la citotoxicidad porcentual.

La citotoxicidad porcentual se calculó utilizando la ecuación:  

$$\% \text{ de citotoxicidad} = ((L_s - L_{SR}) / (L_{MR} - L_{SR})) * 100 \%$$
 donde L<sub>SR</sub> es la luminiscencia basal de las células diana y L<sub>MR</sub> es la liberación máxima de calceína de las células lisadas por digitonina. La CE<sub>50</sub> para la citotoxicidad se determinó utilizando el programa informático Prism (GraphPad). Los valores se calcularon utilizando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros y se muestran en la Tabla 12 y en las Figuras 5A y 5B.

La actividad CDC del Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 2 contra las células Daudi y Raji disminuye significativamente en comparación con el anticuerpo correspondiente que tiene una región constante de la cadena pesada de ts. Véase la Tabla 12 y las Figuras 5A/B. Con el Anticuerpo 1 se observó cierta actividad CDC contra las células Raji, sin embargo, los resultados globales muestran que los anticuerpos quiméricos montan respuestas efectoras más débiles que los anticuerpos de control con Fc de IgG 1 de ts.

**Tabla 12: Los anticuerpos biespecíficos CD20xCD3 que comprenden regiones CH quiméricas presentan actividad reducida en ensayos de CDC que miden la función efectora**

CDC				
Célula diana→	Daudi		Raji	
	CE <sub>50</sub> [M]	Citotoxicidad máxima (%)	CE <sub>50</sub> [M]	Citotoxicidad máxima (%)
Ac 4 de control	6,12E-08	~ 95	1,98E-08	~ 85
Ac 1	SA	SA	2,86E-08	~ 45
CDC				
Ac 2	SA	SA	3,49E-08	~ 10
SA: Sin actividad				

**Ejemplo 7. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 que comprenden regiones CH quiméricas muestran una función efectora disminuida en un ensayo de ADCC**

Para examinar el efecto del Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 2 frente al anticuerpo biespecífico con regiones CH de tipo silvestre (y regiones variables idénticas) sobre la función efectora ADCC, se sembraron en placas linfocitos NK positivos para CD56 no estimulados recién aislados o células NK92 diseñadas técnicamente para expresar el alelo V de mayor afinidad del FcγRIIIA, con células Raji o Daudi positivas para CD20 marcadas con calceína en presencia de anticuerpos con CH quimérico (Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2) y anticuerpo de control con CH de ts (Anticuerpo 4 de control). Se controló la liberación de calceína de las células diana y se determinó el porcentaje de citotoxicidad. El porcentaje de citotoxicidad y la CE<sub>50</sub> se calcularon como se describe anteriormente para el ensayo de CDC. Los resultados se muestran en la Tabla 13 y en las Figuras 6A y 6B.

Los anticuerpos con CH quimérico, el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 2, no median la actividad ADCC (Tabla 13) contra las células Raji o Daudi.

**Tabla 13: Los anticuerpos biespecíficos CD3 x CD20 que comprenden regiones CH quiméricas presentan actividad reducida en ensayos de ADCC que miden la función efectora**

ADCC				
Célula diana→	Daudi		Raji	
	CE <sub>50</sub> [M]	Citotoxicidad máxima (%)	CE <sub>50</sub> [M]	Citotoxicidad máxima (%)
Ac 4 de control	1,87E-10	~ 70 <sup>#</sup>	1,48E-09	~65 <sup>#</sup>
Ac 1	SA	SA	SA	SA
Ac 2	SA	SA	SA	SA
SA: Sin actividad; #: citotoxicidad de fondo ~ 20 %				

**Ejemplo 8. Afinidades de unión obtenidas por resonancia de plasmón superficial y constantes cinéticas de los anticuerpos quiméricos**

Los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 x anti-CD20 que tienen regiones constantes de la cadena pesada quiméricas, los Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2, se analizaron usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) (Biacore) para determinar sus parámetros cinéticos de unión a los receptores Fcγ humanos y de cinomolgo. Los controles de isotipo, en concreto, el control de isotipo de IgG1 de ts y el control de isotipo CPPC de IgG4 de ts, analizaron de manera similar.

Brevemente, se realizaron experimentos de SPR a 25 °C en un instrumento Biacore T200 que emplea un chip recubierto con carboximetil dextrano (CM-5). Se inmovilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-penta-histidina (GE Healthcare) en la superficie del chip sensor CM-5 usando química convencional de acoplamiento de amina. Se capturaron 140 UR-376 UR de proteínas FcγR humanas o de mono etiquetadas con His en el chip CM-5 anti-penta-histidina acoplado a amina y se inyectaron soluciones madre de los anticuerpos a 20 μl/min durante 2,5 min sobre las proteínas capturadas. Se controló la respuesta de unión a AcM y, se calculó el equilibrio de unión en la situación de equilibrio para los receptores de baja afinidad. Las constantes de asociación (k<sub>a</sub>) y disociación (k<sub>d</sub>) cinéticas se determinaron procesando y ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático de ajuste de curvas Scrubber 2.0. Las constantes de disociación en equilibrio de unión (K<sub>D</sub>) y las semividas disociativas (t<sub>1/2</sub>) se calcularon a partir de las constantes cinéticas como: K<sub>D</sub> (M) = k<sub>d</sub> / k<sub>a</sub>; y t<sub>1/2</sub> (min) = (ln2)/(60\*k<sub>d</sub>).

**Tabla 14: Parámetros cinéticos de unión para los anticuerpos de cadena pesada quimérica y de tipo silvestre (ts)**

Unión al FcγRI humano capturado con His a 25 °C				
Anticuerpo	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (10 <sup>-9</sup> M)	T <sup>1/2</sup> (min)
Control de isotipo de IgG1 de ts	1,74E+05	7,48E-04	4,3	15
Control de isotipo CPPC de IgG4 de ts	1,71E+05	2,36E-03	13,9	5

Ac 1	SU	SU	SU	SU
(continuación)				
<b>Unión al FcγRI humano capturado con His a 25 °C</b>				
<b>Anticuerpo</b>	<b>k<sub>a</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>k<sub>d</sub> (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sub>D</sub> (10<sup>-9</sup>M)</b>	<b>T<sup>1/2</sup>(min)</b>
Ac 2	SU	SU	SU	SU
SU: No se detectó unión				

5 Como demuestran los resultados de la Tabla 14, los anticuerpos biespecíficos Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 no presentan en el ensayo de SPR unión al FcγRI humano, en comparación con los anticuerpos que tienen la región CH de hlgG 1 o CPPC de IgG4 de tipo silvestre. Los anticuerpos biespecíficos de cadena pesada quimérica también presentan una unión débil o nula para varios de los receptores FcRγ humanos de baja afinidad (por ejemplo, unión débil a FcRγIIA, FcRγIIIB, y sin unión detectada a FcRγI, FcRγIIIA o FcRγIIIB humano), en comparación con los anticuerpos con la secuencia de Fc de hlgG1 o CPPC de hlgG4 de ts (Tabla 15, a continuación).

**Tabla 15: Unión en situación de equilibrio para los anticuerpos de cadena pesada quimérica y de tipo silvestre (ts)  
Unión a receptores FcγR humanos y de cinomolgo de baja afinidad capturados por His a 25 °C**

Anticuerpo analizado	Valores de $K_D$ ( $10^{-6}$ M) para la unión del FcγR de baja afinidad a anticuerpos de cadena pesada quimérica									
	hFcγRIIA humano (H131)	FcγRIIA humano (R131)	FcγRIIA de cinomolgo	FcγRIIB humano	FcγRIIB de cinomolgo	FcγRIIA humano (V176)	FcγRIIA humano (F176)	FcγRIIA de cinomolgo	FcγRIIB humano	FcγRIIB de cinomolgo
Control de isotipo IgG1 de ts	1,1	2	4,2	2	4,2	1,5	1,3	0,6		2,3
Control de isotipo IgG4ts (CPPC)	12	10	19,3	9,8	9,6	10	26	5,8		SU
Ac 1	12	19,3	23,1	123	13,9	SU	SU	66,3		SU
Ac 2	11,7	20,5	23,5	233	14,6	SU	SU	42,4		SU

SU: No se detectó unión

**Ejemplo 9. Perfil farmacocinético de los anticuerpos quiméricos**

El perfil toxicocinético del Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 2 se evaluó mediante la obtención de muestras de sangre de monos cinomolgo machos (3 animales/grupo de tratamiento) que recibieron una infusión i.v. de 30 minutos, seguido de un período de observación de 12 semanas. Se recogieron muestras de sangre para el análisis toxicocinético de las concentraciones totales de fármaco en suero predosis y postdosis, a los 5 minutos, a las 5, 24, 48, 72 y 168 horas, y los 14, 21, 35, 49, 66 y 84 días. Las muestras de suero resultantes se analizaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas directo (ELISA), para determinar la concentración farmacológica total del Ac 1 o el Ac 2. La toxicocinética de los artículos de prueba se evaluó mediante análisis no compartimental (Phoenix WinNonLin) para determinar los parámetros farmacocinéticos. Los resultados se muestran en la Tabla 16 (ABC = área bajo la curva de concentración frente al tiempo;  $C_{m\acute{a}x}$  = concentración máxima observada en suero).

**Tabla 16: Perfil farmacocinético de los anticuerpos quiméricos en suero de monos cinomolgo después de una infusión intravenosa única a monos cinomolgo**

Parámetro	Unidades	Ac 2 1 mg/kg		Ac 1 1 mg/kg	
		Media	DT	Media	DT
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/ml l}$	33,4	3,79	26,0	4,72
$C_{m\acute{a}x}/\text{Dosis}$	$\text{kg}^*\mu\text{g/ml/mg}$	33,4	3,79	26,0	4,72
$t_{m\acute{a}x}$	día	0,0243	0	0,0243	0
$\text{ABC}_{0-168\text{ h}}$	día. $\mu\text{g/ml}$	100	20,1	61,1	8,04
$\text{ABC}_{0-168\text{ h}}/\text{Dosis}$	día $^*\text{kg}^*\mu\text{g/ml/mg}$	100	20,1	61,1	8,04
T1/2	Día	8,14	1,15	14,0	2,64

Después de una única dosis intravenosa de 1,0 mg/kg de Ac 1 y de Ac 2 en monos cinomolgo, se observaron concentraciones máximas medias ( $C_{m\acute{a}x}$ ) de 33,4 y 26,0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, y valores medios del  $\text{ABC}_{0-168\text{ h}}$  de 100 y 61,1 días $^*\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. La semivida terminal aparente de estas dos moléculas se estimó como de 8,14-14,0 días. Los datos indican que la exposición continua a Ac 1 y Ac 2 se mantuvo en todos los animales durante la mayor parte del período de observación de 12 semanas y la exposición fue comparable entre los grupos de tratamiento. No se observó inmunogenicidad aparente con los artículos de prueba. Los perfiles farmacocinéticos generales de Ac 1 y Ac 2 son típicos de los anticuerpos monoclonales dosificados en mono cinomolgo.

**Ejemplo 10. Los anticuerpos biespecíficos CD3 x CD20 pueden empobrecer a los linfocitos B CD20+ en monos cinomolgo con dosis más bajas que los anticuerpos mono-específicos**

Para determinar la potencia *in vivo* de la administración de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 de control, se examinaron los cambios de los niveles de linfocitos B CD20+ en sangre periférica de monos cinomolgo mediante FACS, después de la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD3xCD20 en comparación con el anticuerpo anti-CD20 mono-específico (Ac 3 de control). El estudio se realizó en monos cinomolgo machos (*Macaca fascicularis*) organizados en ocho grupos de dosificación, de 3 animales por grupo de dosificación, como sigue: El grupo 1 fue el grupo con placebo (administración de control de vehículo); El grupo 2 recibió anticuerpo mono-específico (Ac 3 de control; rituxan) a 30 mg/kg (30 mg/kg en el mono es equivalente a la dosis humana de 375 mg/m<sup>2</sup>, la cual se considera una dosis clínica máxima); el grupo 3 es el anticuerpo de control 4 biespecífico CD3xCD20 a 0,01 mg/kg; Grupo 4 - Anticuerpo 4 a 0,1 mg/kg; Grupo 5 - Anticuerpo 4 a 1 mg/kg; Grupo 6 - Anticuerpo 1 a 0,01 mg/kg; Grupo 7 - Anticuerpo 1 a 0,1 mg/kg; y Grupo 8 - Anticuerpo 1 a 1 mg/kg. Se extrajo sangre el día -7 y el día -4 antes de la dosificación de los animales. Las dosis de fármaco de anticuerpo o de vehículo (placebo) se administraron mediante infusión i.v. y se extrajo sangre a los 2, 4 y 7 días posdosificación. Las muestras de sangre se analizaron por FACS para linfocitos B (CD20; Tabla 17) y marcadores de linfocitos T (CD3, véase a continuación), y se determinó el número absoluto de estos tipos celulares.

Brevemente, se incubaron 100  $\mu\text{l}$  de sangre con 1,5 ml de tampón de lisis de GR en tubos Eppendorf durante tres minutos. Las células se centrifugaron durante cinco minutos a 0,4xg, se lavaron 2x con un lavado con FACS (PBS+SFB al 3%), y se bloquearon durante 10 minutos a temperatura ambiente con reactivo de bloqueo de Fc. Después, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos para hCD45 y CD20 conjugados directamente a reactivos fluorescentes. La determinación cuantitativa de los subconjuntos de linfocitos B (CD20) o subconjuntos de linfocitos T (CD3) se realizó primero utilizando una estrategia de selección heterogénea que consiste en la tinción fluorescente de CD45 y la demarcación de la característica de dispersión lateral (SSC) (CD45brillanteSSCdism) para delinear las poblaciones de glóbulos blancos (GB). Después, se identificaron las poblaciones de linfocitos B mediante el uso de los anticuerpos pertinentes marcados con fluorescencia (CD20 APC-Cy7). Después de la tinción, las células se lavaron dos veces antes de la adquisición por FACS mediante un citómetro FACSCanto y el análisis con el programa informático FlowJo. Los resultados se muestran en la Tabla 17 y en las Figuras 11A y 11B.

**Tabla 17: Número de células positivas para CD45, CD20 circulantes en sangre periférica de mono después del tratamiento**

Tratamiento	N.º de ID del animal	Células CD20+ (E3/µl) en el día del estudio				
		-7	-4	2	4	7
Placebo	78	1,87	2,69	1,85	2,09	1,62
	79	1,28	1,31	0,98	1,24	0,98
	80	2,41	2,90	2,23	2,71	1,78
Ac 3 de control	81	0,71	0,80	0,00	0,00	0,00
	82	0,97	2,49	0,00	0,00	0,00
	83	0,71	1,28	0,00	0,00	0,00
CD3xCD20-Fcts (Ac 4) 0,01 mg/kg	84	2,00	2,82	0,03	0,02	0,03
	85	1,23	1,96	0,00	0,00	0,00
	88	1,50	2,29	0,01	0,00	0,00
CD3xCD20-Fcts (Ac 4) 0,1 mg/kg	87	0,79	1,20	0,00	0,00	0,00
	88	1,72	3,05	0,00	0,00	0,00
	89	0,28	0,60	0,00	0,00	0,00
CD3xCD20-Fcts (Ac 4) 1 mg/kg	90	0,63	1,02	0,00	0,00	0,00
	91	0,66	0,65	0,00	0,00	0,00
	92	0,56	1,50	0,00	0,00	0,00
Ac 1 0,01 mg/kg	93	1,16	1,96	0,00	0,00	0,00
	94	0,72	1,49	0,00	0,04	0,00
	95	1,95	1,94	0,02	0,02	0,01
Ac 1 0,1 mg/kg	96	0,48	0,60	0,00	0,00	0,00
	97	1,30	1,82	0,00	0,00	0,00
	98	4,87	5,00	0,00	0,00	0,00
Ac 1 1 mg/kg	99	0,23	0,34	0,00	0,00	0,00
	00	1,39	1,93	0,00	0,00	0,00
	01	2,29	2,30	0,00	0,00	0,00

5 Como se muestra en la Tabla 17 y en la Figura 11A, la administración de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 y el anticuerpo mono específico anti-CD20 dio como resultado el empobrecimiento de linfocitos B circulantes a los niveles basales en el primer punto temporal medido (día 2). Este empobrecimiento no se observó en la cohorte de animales control con placebo. El agotamiento de linfocitos B en las cohortes con biespecífico se mantuvo durante 1 semana después de la administración de 1 mg/kg de anticuerpos biespecíficos, y el empobrecimiento de linfocitos B también se mantuvo en las cohortes con biespecífico de dosis de 0,01 y 0,10 mg/kg.

10 También se controlaron en este experimento los niveles de linfocitos T (CD3+), mediante anticuerpos anti-CD3 marcados con fluorescencia. El día 2 posdosis se observó una pérdida transitoria de linfocitos T circulantes en las cohortes con biespecífico (Ac 4 y Ac 1; todas las dosis). En los puntos de tiempo medidos no se observó pérdida de linfocitos T (por debajo del valor basal) en los grupos de control de vehículo (placebo) o de Ac 3 de control (Rituxan).  
 15 Los niveles de linfocitos T volvieron a los niveles basales en las cohortes con anticuerpo biespecífico en el punto de tiempo del día 4 y se mantuvieron en los niveles basales hasta el final del experimento (véase la Figura 11B).

20 La potencia *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 se midió en sangre periférica de monos cinomolgo, en un estudio a largo plazo (3 meses) que midió cambios en los niveles de linfocitos B CD20+ o niveles de linfocitos T CD3+, de forma análoga al estudio descrito anteriormente. Se administró placebo (vehículo) o anticuerpos biespecíficos a 1,0 mg/kg en el día 0. Los niveles de linfocitos B en sangre periférica estaban significativamente empobrecidos en el día 2 en ambas cohortes de anticuerpo biespecífico y permanecieron empobrecidos a lo largo del estudio en todas las muestras en todas las muestras, excepto en las con placebo (véase la FIG. 12A). El día 2 se observó una pérdida transitoria de linfocitos T en las cohortes con biespecífico, después, los  
 25 linfocitos T se recuperaron a los niveles basales en el día 4 y permanecieron alrededor del valor basal, según se midió durante todo el estudio (> 80 días) para los animales tratados con anticuerpos biespecíficos (Fig. 12B). No se observó pérdida transitoria de linfocitos T en los animales tratados con placebo.

30 Para medir adicionalmente la potencia *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4, a bajas dosis de administración, se midieron los cambios de los niveles de linfocitos B CD20+ o los niveles de linfocitos T CD3+ en sangre periférica de monos cinomolgo, en un estudio a largo plazo (2 meses), de forma análoga a los experimentos anteriores. Los anticuerpos biespecíficos se administraron a 0,01 mg/kg o 0,001 mg/kg (1 mg/ kg) en el día 0. Los niveles de linfocitos B en sangre periférica estaban significativamente empobrecidos en el día 2 y permanecieron empobrecidos a lo largo del estudio para ambas cohortes de CD3xCD20 (Fig. 13A), de manera similar  
 35 a lo observado para los animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (como se observa en la Tabla 17 y las Figuras 11A o 12A). Los animales tratados con dosis muy bajas (1 mg/kg) de anticuerpos biespecíficos experimentan la misma pérdida transitoria de linfocitos T y la recuperación que se observa en los

animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (véase la Fig. 13B, en comparación con la Figura 11B o 12B).

- 5 La pérdida de linfocitos B, como se observó en los estudios descritos, se correlacionó con la pérdida de anticuerpos circulantes en sangre periférica de los animales tratados con el Anticuerpo 1 CD3xCD20-Fc (véase la Figura 14). A medida que la exposición de los anticuerpos en la circulación de los animales se empobrece con el tiempo, las poblaciones de linfocitos B comienzan a recuperarse (por ejemplo, como se observa en el día 81 para el animal n.º 106881).
- 10 La correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos circulantes en la sangre periférica también se observó en los animales tratados con Anticuerpo 2 de CD3xCD20-Fc quimérico (véase la Figura 15), mientras que la exposición de los anticuerpos en la circulación de los animales se empobrece con el tiempo, después, las poblaciones de linfocitos B comienzan a recuperarse (por ejemplo, como se observa en el día 66 para el animal n.º 106876, y en el día 68 para el animal n.º 106877). También se observó una correlación similar en animales tratados con el anticuerpo biespecífico CD3xCD20-Fc (Ac 4) (véase la Figura 16). A medida que la exposición de los anticuerpos en la circulación de los animales se empobrece con el tiempo, las poblaciones de linfocitos B comienzan a recuperarse (véase la Figura 16, (por ejemplo, como se observa en el día 91 para el animal n.º 106870, en el día 64 para el animal n.º 106872).

20 **Ejemplo 11. Los anticuerpos biespecíficos CD3 x CD20 pueden empobrecer a los linfocitos B CD20+ en tejidos linfáticos de monos cinomolgo con dosis más bajas que los anticuerpos mono-específicos**

25 Se examinaron los cambios de los niveles de linfocitos B CD20+ en tejidos linfáticos de monos cinomolgo mediante FACS, después de la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD3xCD20 (Anticuerpo 1 o Anticuerpo 4) en comparación con el anticuerpo anti-CD20 mono-específico (Ac 3 de control - Rituxan). El estudio se realizó en monos cinomolgo machos (*Macaca fascicularis*) organizados en ocho grupos de dosificación, de 3 animales por grupo de dosificación, como sigue, de forma análoga a los grupos 1-8 como se describe anteriormente en el Ejemplo 10. Las dosis de fármaco de anticuerpo o de vehículo se administraron mediante infusión i.v. y los animales se sacrificaron, y se recogieron tejidos a los 7 días postdosificación. Las muestras de tejido se analizaron por FACS en cuanto a marcadores de glóbulos blancos (CD45+) y, específicamente, de linfocitos B (CD20+), después, se determinó el % en volumen de los linfocitos B.

35 Se identificaron las poblaciones de linfocitos B mediante el uso de los anticuerpos pertinentes marcados con fluorescencia (CD20 APC-Cy7) y de adquisición por FACS, de manera análoga al método descrito anteriormente para el Ejemplo 10. Los resultados se muestran en la Tabla 18 y en las Figuras 17A y 17B.

**Tabla 18: Porcentaje de células CD20 positivas en ganglio linfático mesentérico y el bazo de mono después del tratamiento**

Tratamiento	N.º de ID del animal	Ganglio linfático mesentérico	Bazo
		Día 7	Día 7
Placebo	78	38,14	63,22
	79	38,57	62,79
	80	37,36	49,17
Ac 3 de control 30 mg/kg	81	6,21	4,5
	82	10,3	3,45
	83	4,21	2,18
Ac 4 0,01 mg/kg	84	13,43	3,14
	85	6,88	2,27
Ac 4 0,1 mg/kg	86	10,78	1,39
	87	1,51	2,37
Ac 4 1 mg/kg	88	0,45	1,65
	89	1,24	2,4
Ac 1 0,01 mg/kg	90	0,63	0,97
	91	0,62	1,93
Ac 1 0,1 mg/kg	92	1,08	1,22
	93	5,38	1,22
Ac 1 0,01 mg/kg	94	6,37	1,89
	95	13,25	6,99
Ac 1 0,1 mg/kg	96	0,43	1,55
	97	0,68	1,75
Ac 1 0,1 mg/kg	98	2,36	2,97

(continuación)

Tratamiento	N.º de ID del animal	Ganglio linfático mesentérico	Bazo
		Día 7	Día 7
Ac 1 1 mg/kg	99	0,33	1,79
	00	1,6	1,71
	01	0,5	1,21

Como se muestra en la Tabla 18 y en la Figura 17A, la administración de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 en comparación con el anticuerpo monoespecífico anti-CD20 dio como resultado el empobrecimiento de linfocitos B tisulares en el bazo a dosis mucho más bajas (dosis de 0,01 a 1,0 mg/kg) para las cohortes con biespecífico. Este empobrecimiento no se observó en la cohorte de animales control con placebo.

Como se muestra en la Tabla 18 y en la Figura 17B, la administración de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 en comparación con el anticuerpo monoespecífico anti-CD20 dio como resultado el empobrecimiento de linfocitos B tisulares en ganglios linfáticos mesentéricos a dosis mucho más bajas (dosis de 0,01 a 1,0 mg/kg) para las cohortes con biespecífico, dando como resultado la dosis de anticuerpo biespecífico 0,1 mg/kg y la dosis de 1 mg/kg un empobrecimiento de linfocitos B más eficaz que en la cohorte con monoespecífico. Este empobrecimiento no se observó en la cohorte de animales control con placebo. Tras la tinción inmunohistoquímica para CD20 (datos no mostrados), se detectaron linfocitos B residuales en los ganglios linfáticos de la cohorte tratada con monoespecífico (Rituxan® 30 mg/kg). No se detectaron linfocitos B residuales en los tejidos recogidos de las cohortes tratadas con dosis de 0,1 a 1,0 mg/kg de anticuerpo biespecífico anti-CD3xCD20. Estos datos demuestran que el Ac1 y Ac1 tienen una capacidad de destrucción de linfocitos B que es más fuerte que la del Ac3.

#### Ejemplo 12. Tratamiento de tumores con anticuerpos biespecíficos CD3 x CD20

##### A. El tratamiento con anticuerpo biespecífico CD20 x CD3 suprime el crecimiento de tumores Raji en ratones NSG

Para evaluar la eficacia de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3xCD20 seleccionados en la reducción del crecimiento de tumores Raji, Ratones NSG (ratones NOD/ItSz-scid/IL2Ry<sup>nu/nu</sup>) comprados en Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EE. UU.) se implantaron por vía subcutánea con  $2 \times 10^6$  células tumorales Raji y  $5 \times 10^5$  CMSP humanas (día 0). El mismo día, los ratones se trataron con una dosis intraperitoneal de 0,4, 0,04 o 0,004 mg/kg por ratón (N=5 ratones por grupo de tratamiento) de Anticuerpo 1, o Anticuerpo 5 de control (un anticuerpo IgG 1 frente a una diana irrelevante), o control de vehículo. Comenzando el día 0, los ratones se trataron dos veces por semana con una dosis intraperitoneal de fármaco o de vehículo durante el resto del estudio. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana usando calibradores y se calculó el volumen tumoral como Volumen = (largo x ancho<sup>2</sup>)/2. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático GraphPad Prism 5.0 (versión Macintosh).

La significación estadística se determinó mediante ANOVA bidireccional, con comparaciones múltiples de Tukey posprueba. Los datos de cada una de las lecturas se compararon entre los grupos de tratamiento. Un umbral de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

Los resultados se muestran en las Figuras 7A-7F. Estos resultados muestran que el Anticuerpo 1 (CD3xCD20-Fcquimérico) se dirige a los tumores Raji en ratones que tienen células inmunes humanas coimplantadas, dando como resultado la supresión completa del crecimiento tumoral a las dosis analizadas (Figura 7C: Ac1 0,4 mg/kg; FIG. 7E: Ac1 0,04 mg/kg; FIG. 7F: Ac1 0,004 mg/kg). Este ejemplo demuestra que el tratamiento con el Anticuerpo 1 biespecífico CD3xCD20 fue eficaz para inhibir el crecimiento tumoral a partir del momento de la implantación del tumor. El crecimiento de tumores Raji permaneció completamente suprimido hasta 23 días post-implantación en los ratones que recibieron dosis de 0,4, 0,04 o 0,004 mg/kg de Anticuerpo 1, con respecto al control. También se observó que ni el Anticuerpo 1 ni el anticuerpo de control tuvieron un efecto significativo sobre el peso corporal del ratón durante el estudio (datos no mostrados).

El efecto antitumoral de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 se analizó adicionalmente en un modelo de ratón NSG similar (como se describió anteriormente), sin embargo, cada ratón NSG recibió una dosificación de 1 mg de IgG de ratón (Fc de mlgG2a) en el día -1, y una vez por semana a partir de entonces. Los resultados se muestran en las Figuras 8A-8B.

Este experimento demuestra que el tratamiento con el Anticuerpo 1 biespecífico CD3xCD20 (CD3xCD20-Fcquimérico) o el Anticuerpo 4 biespecífico CD3xCD20 (CD3xCD20-Fcts) fue eficaz para inhibir el crecimiento tumoral a partir del momento de la implantación del tumor a las dosis de Ac biespecífico analizadas en presencia de IgG circulante (Figuras 8A-8B). Como se observa en la Fig. 8A, En este experimento, el Anticuerpo 1 (anticuerpo biespecífico CD3xCD20-Fcquimérico) demuestra una inhibición completa del crecimiento tumoral durante el período de tiempo analizado con o sin suplemento de IgG.

**B. El tratamiento con anticuerpo biespecífico CD3 x CD20 reduce tumores Raji en ratones NSG**

Se evaluó la eficacia de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3xCD20 seleccionados en la reducción de tumores establecidos en ratones NSG. Los ratones NSG (ratones NOD/ItSz-scid/IL2Rγ<sup>nu/lo</sup>) se compraron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EE. UU.) y se co-implantaron por vía subcutánea con células tumorales Raji con HLA compatible (2x10<sup>6</sup>) y CMSP humanas (5x10<sup>5</sup>) (día -15). Se permitió que los tumores se establecieran en el hospedador durante 15 días antes del tratamiento. Un día antes de la administración del fármaco (día -1), se proporcionó a cada uno de los ratones dosis de suplementos de 5 mg de Fc de mlgG2a. Posteriormente se les proporcionó a los ratones dosis de Fc de mlgG2a a 5 mg por ratón, una vez por semana durante la duración del experimento (día 7, día 14, etc.). Los ratones se separaron en 2 grupos experimentales antes de la administración del fármaco, de acuerdo con el tamaño del tumor: Grupo 1: ~200-400 mm<sup>3</sup> o Grupo 2: ~500-900 mm<sup>3</sup>.

Después del tratamiento farmacológico, en los días 0, 3, 6, 10, 14, 17, 21 y 28 se controló y registró en cada ratón el tamaño del tumor. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana usando calibradores y se calculó el volumen tumoral como Volumen = (largo x ancho<sup>2</sup>)/2. La presencia de tumores también se determinó por palpación. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático GraphPad Prism 5.0 (versión Macintosh). Los datos de cada una de las lecturas se compararon entre los grupos de tratamiento. Los resultados se muestran en las Figuras 9 y 10.

a. Grupo 1: tumores de ~200-400 mm<sup>3</sup>. Comenzando el día 0, varias cohortes de 4 o 5 ratones cada una se trataron con la dosis indicada de fármaco o con vehículo, una vez por semana. (es decir el día 7, día 14, etc.) de la siguiente manera:

- i. Control: vehículo solo
- ii. Anticuerpo 5 de control, 0,4 mg/kg
- iii. Anticuerpo 1 (CD20xCD3-Fcquimérico), 0,4 mg/kg

b. Grupo 2: tumores de ~500-900 mm<sup>3</sup>. Comenzando el día 0, varias cohortes de 4 ratones cada una se trataron con la dosis indicada de fármaco, una vez por semana. (es decir el día 7, día 14, etc.) de la siguiente manera:

- i. Anticuerpo 5 de control, 0,4 mg/kg
- ii. Anticuerpo 1 (CD20xCD3-Fcquimérico), 0,4 mg/kg

Los tumores retrocedieron completamente en la cohorte a la que se le administró Anticuerpo 1 0,4 mg/kg (CD20xCD3-Fcquimérico) durante 14 días. Véase la Figura 9.

En el modelo con tumores establecidos más grandes (es decir, Grupo 2, ~500-900 mm<sup>3</sup>), a los 21 días, el tratamiento con el Anticuerpo 1 (CD20xCD3-Fcquimérico) (0,4 mg/kg) dio como resultado la eliminación completa de los tumores observados en ratones. Véase la Figura 10, que demuestra la eficacia del Ac1 en el tratamiento de ratones con grandes masas de linfoma (es decir, tumores positivos para la expresión de CD20), mayores de 0,5 cm y de hasta 0,9 cm de volumen.

**Ejemplo 13. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 inducen la proliferación de CMSP *in vitro***

La capacidad de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 seleccionados y las construcciones de control para estimular a las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y de inducir proliferación se evaluó mediante cuantificación catalizada por ATP (CellTiter Glo®). La activación de las CMSP da como resultado la liberación de citocinas que impulsan la proliferación celular.

Los datos de proliferación se obtuvieron utilizando el siguiente protocolo: Se incubaron las CMSP (5x10<sup>5</sup>/ pocillo) procedentes de mono cinomolgo o ser humano con diluciones en serie de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 o de anticuerpo de control, y con anticuerpo anti-CD28 comercial (humano: 200 ng/ml, cinomolgo: 500 ng/ml), durante 72 horas a 37 °C. Las células se cuantificaron usando Cell Titer Glo® y se midió la luminiscencia como lectura para la viabilidad celular usando un lector de placas de marcaje múltiples VICTOR X5 (Perk-inElmer) para detectar células vivas. La viabilidad celular (veces de inducción de células estimuladas frente a no estimuladas) se determinó dividiendo la luminiscencia de las células estimuladas por la luminiscencia basal de las células no estimuladas, y se representó en una gráfica utilizando el programa informático Prism. Los resultados se resumen en la Tabla 19 y en las Figuras 18A y 18B.

**Tabla 19. CE<sub>50</sub> para la proliferación de CMSP de humanas y de cinomolgo inducida por los anticuerpos biespecíficos anti-CD3x CD20**

Anticuerpo	CE <sub>50</sub> [M] para la proliferación de CMSP humanas	CE <sub>50</sub> [M] para la proliferación de CMSP de cinomolgo
Ac 5 de control	SA	SA
CD3xCD20-FcTs (Ac 4)	8,427E-12	3,325E-11
Anticuerpo 1	1,163E-10	1,275E-11

(continuación)

Anticuerpo	CE <sub>50</sub> [M] para la proliferación de CMSP humanas	CE <sub>50</sub> [M] para la proliferación de CMSP de cinomolgo
Los datos son valores medios de 3 o más ensayos independientes. SA = sin actividad.		

Como se muestra en la Tabla 19 y en las Figuras 18A-18B, ambos anticuerpos biespecíficos CD20 x CD3 de la invención indujeron la proliferación de CMSP humanas o de cinomolgo. El Anticuerpo 1 indujo la proliferación tanto de CMSP humanas como de cinomolgo, con una potencia aproximadamente igual. El Ac 5 de control no presentó actividad.

**Ejemplo 14. Los biespecíficos CD20 x CD3 median la destrucción celular por linfocitos T activados *in vitro***

Se aislaron CMSP humanas y de cinomolgo sobre Ficoll-Plaques o utilizando medios de separación de células Lympholyte Mammal, respectivamente. Las CMSP aisladas (1x10<sup>6</sup> células/ml de CMSP humanas o 5x10<sup>6</sup> células/ml de CMSP de cinomolgo) se activaron durante 7 y 21 días, respectivamente, en medios completos (RPMI complementado con SFB al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, L-glutamina 292 µg/ml) que contenían IL-2 humana recombinante (30 U/ml para las CMSP humanas, 100 U/ml para las CMSP de cinomolgo) y perlas de activación de linfocitos T (anti-CD3/CD28 para las CMSP humanas, anti-CD2/CD3/CD28 para las CMSP de cinomolgo). Las células Raji que expresan CD20 (2x10<sup>6</sup> células/ml) se marcaron con Calceína-AM 8 µM durante 30 minutos a 37 °C y se lavaron 3 veces con medio. Las células diana marcadas con calceína (10.000-20.000 células/pocillo) se sembraron en placas en 200 µl, con linfocitos T activados (relación célula efectora/ diana de 10:1) y diluciones en serie del Anticuerpo 1, Ac 4 o Ac 5 de control (intervalo de concentración para humanas: 2 nM a 0,00003 nM; intervalo de concentración para cinomolgo: 6,6 nM a 0,002 pM) en medio completo durante 2 horas a 37 °C. Después de la incubación, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a una placa negra translúcida de fondo transparente para el análisis de fluorescencia. La citotoxicidad porcentual se calculó utilizando la ecuación:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = ((FS - FSR)/(FMR-FSR))*100 \%,$$

donde FS es la liberación de calceína del pocillo de prueba, FSR es la liberación espontánea de calceína y FMR es la liberación máxima de calceína de las células lisadas con Triton-X.

La CE<sub>50</sub> de viabilidad celular (cuantificación catalizada por ATP) se determinó utilizando el software Prism. La lisis celular (citotoxicidad) se midió mediante la liberación de calceína como una fracción de la liberación máxima. La citotoxicidad celular porcentual se calculó como la liberación observada en comparación con la liberación máxima y se determinaron los valores de la CE<sub>50</sub>. Los resultados se muestran en la Tabla 20 y en las Figuras 19A (linfocitos T de ser humano) y 19B (linfocitos T de mono).

**Tabla 20. Valores de CE<sub>50</sub> para la citotoxicidad inducida por CD3xCD20 para células Raji**

Anticuerpo	Citotoxicidad de linfocitos T humanos activados para Raji [M]	Citotoxicidad de linfocitos T de mono activados para Raji [M]
Ac 5 de control	SA	NP
CD3xCD20-FcTs (Ac 4)	1,571 E-11	1,730E-12
Anticuerpo 1	2,503E-11	9,104E-12
SA = Sin actividad; NP = no probado.		

Como se muestra en la Tabla 20, El Anticuerpo 1 medió la destrucción de células diana con unos valores de CE<sub>50</sub> representativos de 25,0 pM y 9,10 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. El Anticuerpo 4 medió la destrucción de células diana con unos valores de CE<sub>50</sub> representativos de 15,7 pM y 1,73 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. No se observó actividad del control.

Para controlar la destrucción específica de las células diana potadoras de CD20 mediante citometría de flujo, se marcaron células B16F10.9 de mieloma murino parental (que no expresan CD20) y células B16F10.9 diseñadas técnicamente para expresar de forma estable CD20 humano (B16F10.9/CD20) con 1 µM de los colorantes fluorescentes de rastreo N-succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) y Cell Tracker violeta, respectivamente. Después del marcaje, las células se mezclaron en una relación de 1:1 y se sembraron en placas durante una noche a 37 °C. Por separado, se sembraron en placas CMSP humanas en medio RPMI complementado a 1x10<sup>6</sup> células/ml y se incubaron durante una noche a 37 °C para enriquecer los linfocitos al empobrecer los macrófagos adherentes, las células dendríticas y algunos monocitos. Al día siguiente, las células diana se coincubaron con CMSP indiferenciadas empobrecidas en células adherentes (relación célula efectora/diana de 4:1) y con una dilución en serie de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 de prueba o el Anticuerpo 5 de control de IgG 1 (intervalo de concentración: 66,7 nM a 0,25 pM) durante 48 horas a 37 °C. Las células se retiraron de las placas de cultivo celular usando un tampón de disociación de células sin enzimas, y se analizaron mediante FACS. Para el análisis por FACS,

5 las células se tiñeron con un rastreador en el rojo lejano de glóbulos rojos muertos/vivos (Invitrogen). Para la evaluación de la especificidad de la destrucción, las células se seleccionaron como poblaciones vivas marcadas con violeta y CFDA-SE. Para el cálculo de la supervivencia ajustada se informó el porcentaje de cada población de la siguiente manera: Supervivencia ajustada=(R1/R2)\*100, donde R1=[(B16F10.9/CD20) / células testigo (B16F10.9)]\*100 en ausencia de anticuerpo, y R2=la misma relación pero en presencia de anticuerpo de prueba.

**Tabla 21. Valores de CE<sub>50</sub> para la destrucción específica de diana en células B16F10.9/CD20**

Anticuerpo	% de supervivencia células B16F10.9/CD20 [M]
Ac 5 de control	SA
CD3xCD20-FcTs (Ac 4)	1,282E-11
Anticuerpo 1	1,952E-11
SA = Sin actividad.	

10 Tanto el CD3xCD20-Fcquimérico (Anticuerpo 1) como el CD3xCD20-FcTs (Anticuerpo 4) dirigieron de forma específica a los linfocitos T humanos a destruir solo las células diana que expresaban CD20 (Figuras 20A-B) en una población mixta de células. La destrucción de células diana solo se observó en presencia del anticuerpo biespecífico, con un empobrecimiento de las células B16F10.9/CD20 de forma dependiente de la dosis por el Anticuerpo 1 (CE<sub>50</sub> 19,5 pM) y Anticuerpo 4 (CE<sub>50</sub> 12,8 pM) (Figura 20B). Menos del 5 % de las células que expresan CD20 estaban vivas a la dosis más alta analizada (10 µg/ml) (Figura 20B). No se observó evidencia de muerte celular en la población de células B16F10.9 parentales o en la población B16F10.9/CD20 con Ac 5 de control, un anticuerpo de control de IgG1.

**Ejemplo 15. El anticuerpo biespecífico CD3xCD20 regula al alza el marcador temprano de activación CD69 en linfocitos T en un ensayo FACS *in vitro* de 20 horas**

20 CD69+ es uno de los primeros marcadores de superficie celular inducibles que indica que los linfocitos T se han activado. La activación de los linfocitos T se puede determinar examinando la regulación al alza de marcadores específicos de superficie celular, tales como CD69.

25 Se determinó la capacidad del anticuerpo biespecífico CD3xCD20 para regular al alza el marcador temprano de activación CD69 en linfocitos T humanos o de cinomolgo en sangre entera en un ensayo FACS *in vitro* de 20 horas. Brevemente, la activación de linfocitos T se evaluó incubando sangre entera (100 µl) humana o de cinomolgo recién aislada en placas de 96 pocillos de fondo plano, con diluciones en serie con factor 5 (humana) o 10 (de cinomolgo) de Anticuerpo 1, Anticuerpo 4 o Ac 5 de control (intervalo de concentración de 50 nM a 0,0006 nM) en RPMI+L-glutamato, en un volumen final de 200 µl, durante 20 horas a 37 °C. Después de la incubación, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm y se retiró el plasma. Para medir la regulación al alza de CD69 en los linfocitos T, se añadió directamente a la sangre un cóctel de fenotipado que contenía anticuerpos directamente conjugados para CD2 y CD69, así como para CD45, CD4, CD8 y CD19 (humanos) o CD16 (de cinomolgo), durante 30 minutos a 4 °C. Los glóbulos rojos se lisaron durante 15 minutos con 1,5 ml de tampón Pharmlyse, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 200 µl de PBS frío + SFB al 1 %, y se analizaron por citometría de flujo utilizando un citómetro BD FACSCanto. Los linfocitos T CD4+ se identificaron en primer lugar seleccionando linfocitos CD45+ pequeños viables y luego seleccionando linfocitos T CD19-/CD2+/CD4+ (humana) o linfocitos T CD16-/CD2+/CD4+ (cinomolgo).

40 Se informa el porcentaje de los linfocitos activados (CD69+) del total de células efectoras CD2+. Véase la Tabla 22 y también la Figura 21. Los resultados muestran que los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 activaron significativamente los linfocitos T detectados mediante el marcador temprano de activación CD69.

**Tabla 22. Valores de CE<sub>50</sub> para la destrucción específica de diana en células B16F10.9/CD20**

Anticuerpo	% de linfocitos activados (CD69+) [M]
Ac 5 de control	SA
CD3xCD20-FcTs (Ac 4)	7,907E-11
CD3xCD20-Fcquimérico (Anticuerpo 1)	1,560E-11
SA = Sin actividad.	

45 **Ejemplo 16. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 inducen el agrupamiento de linfocitos T con células diana**

50 Se usó un formato de agrupamiento de células para determinar que el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 conectó a los linfocitos T con las células diana (células CD20+) a través de sus brazos de unión biespecífica. Las células efectoras se preñaron con CFSE, y las células CD20+ se preñaron con Cell Tracker violeta durante 24 horas, y se seleccionaron para separar los cuadrantes después de la incubación con un anticuerpo irrelevante de control (Anticuerpo 5 de control, anticuerpo de isotipo IgG 1 irrelevante). Véase la Figura 22A, que representa el no

agrupamiento (doble tinción) en la mezcla de células para el tratamiento con anticuerpo irrelevante. Después de la incubación con anticuerpo biespecífico CD3xCD20, los agrupamientos de células aparecen debido a la tinción con CFSE y violeta (véase la Figura 22B, en el cuadrante superior izquierdo en el diagrama de dispersión, destacado con el cuadrado en negrita).

5

#### **Ejemplo 17. Expresión de los marcadores inhibidores Tim-3 y PD-1 en células CD3+**

En hospedadores portadores de tumores se produce disfunción o agotamiento de linfocitos T. Los receptores Tim-3 y PD-1 se han identificado en patologías crónicas como marcadores de linfocitos T agotados. De acuerdo con los investigadores Sakuishi, K. *et al.* (J. Exp. Med. 207(10):2187-2194, 2010), los linfocitos infiltrantes de tumores (los TIL, forma sigla de *tumor-infiltrating lymphocytes*), que son positivos para Tim-3 y PD-1 (los TIL Tim-3+PD-1+) presentan el fenotipo de agotamiento más intenso, definido por incapacidad para proliferar y producir IL-2, TNF e IFN- $\gamma$ .

10

Se extrajeron células positivas para CD3 de sangre y tumores de ratones NSG que se coimplantaron por vía subcutánea con células tumorales Raji con HLA coincidente y CMSP humanas - véase el Ejemplo 12B, anteriormente en el presente documento. Brevemente, se permitió que los tumores se establecieran en el hospedador durante 15 días antes del tratamiento, después, los ratones se separaron en dos grupos de tratamiento basándose en el tamaño tumoral (véase el Ejemplo 12B). El día 9 se extrajo sangre de los ratones tratados (Ac biespecífico) y no tratados de cada grupo de estudio, es decir, el grupo 1, ~200-400 mm<sup>3</sup> o grupo 2, ~500-900 mm<sup>3</sup>. Los ratones que no fueron tratados (vehículo o Ac de control) con tumores que alcanzaban los 1500 mm<sup>3</sup> se sacrificaron al final del estudio y se analizó la expresión de PD1 y Tim-3 en estos tumores.

15

20

Para los experimentos con linfocitos T circulantes, se seleccionaron fracciones de linfocitos T CD45+ CD3+ viables para la identificación de marcadores usando anticuerpos marcados directamente para Tim-3 o PD-1 (disponible en el mercado de Biolegend). Las células Tim-3+PD-1+ fueron la fracción predominante de linfocitos T circulantes en la sangre de animales no tratados. Sin embargo, los linfocitos T en la sangre de los animales tratados con anticuerpo biespecífico CD20xCD3 (Ac 1) presentaron fracciones más bajas de células Tim-3+PD-1+.

25

Se separaron y se tiñeron células tumorales de los hospedadores no tratados para determinar la viabilidad. Se realizó análisis de FACS para células individuales viables para clasificar las fracciones celulares CD45+ CD3+, que luego se analizaron en cuanto a la expresión de Tim-3 o PD-1.

30

Los inventores han descubierto que los receptores inhibidores Tim-3 y PD-1 se expresaban en los TIL CD3+ en los linfomas de linfocitos B de NSG de ratones no tratados durante los experimentos descritos en el Ejemplo 12B, y que las células Tim-3+ PD-1+ eran la fracción predominante de los linfocitos T infiltrantes de tumor.

35

#### **Ejemplo 18. El tratamiento con el anticuerpo biespecífico CD3 x CD20 es más eficaz que el anticuerpo anti-CD20+ en ratones NSG con tumores Raji establecidos**

Se evaluó la eficacia de los anticuerpos biespecíficos anti-CD3xCD20 seleccionados en la reducción de tumores establecidos en ratones NSG. Se coimplantaron ratones NSG (NOD/ItSz-scid/IL2R $\gamma$ nulo; Jackson Laboratories) por vía subcutánea con células tumorales Raji (2x10<sup>6</sup>) y CMSP humanas (5x10<sup>5</sup>) (en el día -14) (de manera similar al ejemplo 12B anterior).

40

El Ac1 CD20xCD3 biespecífico (dosificado a 0,4 mg/kg; 2x/semana i.p.) fue comparable al BiTE CD19xCD3 (dosificado a 0,5 mg/kg; 5x/semana i.v.) (Figura 23) y superior a la terapia con rituximab (dosificado a 8 mg/kg; 5x/semana i.p.) (Figura 24), en la supresión de tumores de Raji establecidos, demostrando de este modo que el Ac1 era eficaz en el tratamiento de mamíferos con grandes masas de linfoma con un volumen de más de 0,5 cm.

45

#### **Ejemplo 19. Tratamiento de melanoma CD20+ con anticuerpo biespecífico CD3 x CD20**

Los investigadores han determinado que determinadas subpoblaciones de cánceres de melanoma de pacientes, tales como las células tumorales de melanoma CD20+, puede representar características de inicio de tumor y un mayor riesgo de recidiva de la enfermedad (Pinc *et al.* Mol Ther. 20(5):1056-1062, 2012, epub 21 de febrero de 2012). El anticuerpo biespecífico CD20xCD3 Ac1 demostró una potente actividad contra las células tumorales B16F10.9 que expresan CD20, dado que retrasó de forma significativa el crecimiento tumoral de B16F10.9 transducidas con hCD20 (B16F10.9/CD20) en ratones inmunocompetentes.

55

Se humanizaron en el locus CD20 ratones humanizados para CD3 (ratones humanizados CD3 $\gamma$ e), de forma que los ratones expresaran ambas proteínas humanizadas. Se les implantó a los ratones humanizados CD3/CD20, por vía subcutánea, 2x10<sup>5</sup> células tumorales de melanoma B16F10.9 (K. Peters/Charles Lin; Duke University) transducidas con CD20 humano. A partir del día 0 (día del trasplante de tumor), los ratones se trataron por vía intraperitoneal, 2 veces por semana, con vehículo (PBS; n=5), Ac5 de control 0,4 mg/kg (anticuerpo de control para antígeno irrelevante; n=5), 0,4 mg/kg de Ac1 (N=5) o 0,004 mg/kg de Ac1 (n=5). Los volúmenes tumorales se midieron como se indica en la Fig. 25A. Cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor a 1500 mm<sup>3</sup>, se sacrificaron los ratones. Como se demuestra en la Fig. 25A, cuando se inició simultáneamente con el trasplante tumoral, el tratamiento con Ac1 retrasó

60

65

el crecimiento tumoral.

En un experimento distinto, también se analizó la capacidad de Ac1 para inhibir el crecimiento tumoral en un tumor ya establecido (Fig. 25B). Se les implantó a los ratones humanizados CD3/CD20, por vía subcutánea,  $2 \times 10^5$  células tumorales de melanoma B16F10.9 que expresan CD20 humano. En el día 10 posimplantación del tumor, los ratones se distribuyeron al azar basándose en el tamaño tumoral y se organizaron en los siguientes grupos de tratamiento, 5 ratones en cada grupo: vehículo (PBS), Ac5 de control 4 mg/kg (anticuerpo de control para antígeno irrelevante), 4 mg/kg de Ac1 o 0,4 mg/kg de Ac1. Todos los ratones se trataron i.p. 2 veces por semana. Cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor a  $1500 \text{ mm}^3$ , se sacrificaron los ratones. Como se muestra en la FIG. 25B, el tratamiento con Ac1 retrasó el crecimiento tumoral de tumores ya establecidos, lo que demuestra que el Ac1 presentó una potente actividad contra las células de melanoma B16F10.9 que expresaban CD20.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.  
 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES  
 <130> A0015WO01  
 20 <150> 62/033.460  
 <151> 05-08-2014  
 <150> 62/007.385  
 25 <151> 03-06-2014  
 <150> 61/981.641  
 <151> 18-04-2014  
 30 <150> 61/955.663  
 <151> 19-03-2014  
 <160> 75  
 35 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 382  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 45 <400> 1  
 gaagtacagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggatt cacctttaat gattatgcca tgcactgggt cgggcaagct 120  
 ccaggaagg gcctggaatg ggtctcagtt attagttgga atagtgatag cataggctat 180  
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
 ctgcaaatgc acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat 300  
 cactatgggtt cggggagtta ttactactac caatacggta tggacgtctg gggccaaggg 360  
 accacgggtca cagtctcctc ag 382  
 <210> 2  
 50 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 752 156 T3

<220>  
<223> Sintético

<400> 2

5

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

<210> 3  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Sintético

15

<400> 3  
ggattcacct ttaatgatta tgcc 24

<210> 4  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Sintético

25

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala  
 1 5

30

<210> 5  
<211> 24

ES 2 752 156 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintético

<400> 5  
 attagttgga atagtgatag cata 24

10 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintético

<400> 6  
  
 Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile  
 1 5

20

<210> 7  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintético

<400> 7  
 gcaaaagata atcactatgg ttcggggagt tattactact accaatacgg tatggacgtc 60

30

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintético

<400> 8  
  
 Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr  
 1 5 10 15

Gly Met Asp Val  
 20

45 <210> 9  
 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Sintético

<400> 9

ES 2 752 156 T3

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatacca tgcactgggt cgggcaagct 120  
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag tataggctat 180  
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtcctctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat 300  
 agtggctacg gtcactacta ctacggaatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc 360  
 gtgcctca 369

5 <210> 10  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 10 <400> 10

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

15 <210> 11  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Sintético

ES 2 752 156 T3

<400> 11  
 ggattcacct ttgatgatta tacc 24

5 <210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 12

15 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Thr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

25 <400> 13  
 attagtggga atagtggtag tata 24

<210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintético

35 <400> 14

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
 1 5

40 <210> 15  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintético

<400> 15  
 gcaaaagata atagtggcta cggtcactac tactacggaa tggacgtc 48

50 <210> 16  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Sintético

<400> 16

60 Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

ES 2 752 156 T3

<210> 17  
 <211> 320  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 17  
 10  
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcaaaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcac tatattaact ggctctcac ttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa 320

<210> 18  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Sintético  
 20  
 <400> 18  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

25  
 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 752 156 T3

<220>  
 <223> Sintético

5 <400> 19  
 cagagtgtta gcagcaac 18

<210> 20  
 <211> 6  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

15 <400> 20

**Gln Ser Val Ser Ser Asn**  
**1 5**

20 <210> 21  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintético

<400> 21  
 30 ggtgcatcc 9

<210> 22  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintético

<400> 22

40

**Gly Ala Ser**  
**1**

<210> 23  
 <211> 27  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

50 <400> 23  
 cagcactata ttaactggcc tctcact 27

<210> 24  
 <211> 9  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

60 <400> 24

ES 2 752 156 T3

Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

5 <210> 25  
 <211> 981  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 25

gccagcacia aaggtcctag cgtttttcca cttgccccat gttcaaggtc aacctccgaa 60  
 agtaccgccg ctcttggtctg tctcgtaaaa gattattttc ccgaacctgt aactgtctcc 120  
 tggaaactccg ggcactcac ttccggcgta cataccttcc ccgctgtcct ccaatcttcc 180  
 ggtctctact ccctgtcttc tgttgtcact gttccatcat cctcactcgg cacaaaaaca 240  
 tatacctgca acgttgatca caagccaagt aataccaaag ttgataagcg cgtcgaatcc 300  
 aaatacggtc ccccctgccc accgtgcccga gcaccacctg tggcaggacc atcagtcttc 360  
 ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggacccctga ggtcaogtgc 420  
 gtgggtggtg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 480  
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 540  
 gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600  
 aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 660  
 cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 720  
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctaaccoca ggcacatcgc cgtggagtgg 780  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 840  
 ggctccttct tectctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 900  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagtccttc 960  
 tcctgtctc tgggtaaag a 981

15 <210> 26  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

25 <400> 26

ES 2 752 156 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

ES 2 752 156 T3

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 27  
<211> 981  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Sintético

<400> 27

ES 2 752 156 T3

gccagcacia aaggtcctag cgtttttcca ctggcccat gttcaaggtc aacctccgaa 60  
 agtaccgccg ctcttggtg tctcgtaaaa gattattttc ccgaacctgt aactgtctcc 120  
 tggaaactccg gcgcactcac ttccggcgta cataccttcc ccgctgtcct ccaatcttcc 180  
 ggtctctact cctgtcttc tgttgtcact gttccatcat cctcactcgg cacaaaaaca 240  
 tatacctgca acgttgatca caagccaagt aataccaaag ttgataagcg cgtcgaatcc 300  
 aaatacggtc ccccctgccc accgtgccc gcaccacctg tggcaggacc atcagtcttc 360  
 ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420  
 gtgggtgggg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 480  
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 540  
 gtggtcagcg tcttcacogt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600  
 aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 660  
 cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 720  
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 840  
 ggctccttct tctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 900  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaaca gattcacaca gaagtccctc 960  
 tccctgtctc tgggtaaag a 981

5

<210> 28  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Sintético  
 <400> 28

ES 2 752 156 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 180 185 190

ES 2 752 156 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

- <210> 29
- <211> 990
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Sintético
- 10 <400> 29

ES 2 752 156 T3

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120  
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtectca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgocca ccgtgccag caccacctgt ggcaggacca 360  
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 420  
 gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 480  
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 540

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacogtc ctgcaaccagg actggctgaa cggcaaggag 600  
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 660  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720  
 accaagaacc aggtcagcct gaectgectg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 780  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 840  
 gactccgacg gtcctttott cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900  
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 960  
 aagtccctct ccctgtctcc gggtaaatga 990

<210> 30  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

10

<400> 30

ES 2 752 156 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
130 135 140

ES 2 752 156 T3

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 31  
<211> 990  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintético

10 <400> 31

ES 2 752 156 T3

gcctccacca agggcccatc ggtcttccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60  
 ggcacagcgg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgcg 120  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aatcttctg acaaaactca cacatgocca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggacca 360  
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 420  
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 480  
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 540  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 600  
 tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 660  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc 780  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 840  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900  
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacag attcacgcag 960  
 aagtccctct ccctgtctcc gggtaaatga 990

5 <210> 32  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 32



ES 2 752 156 T3

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 115 120 125  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 130 135 140  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 165 170 175  
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 180 185 190  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 195 200 205  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 210 215 220  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 245 250 255  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 260 265 270  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 275 280 285  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 290 295 300  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 33  
 <211> 981  
 <212> ADN

ES 2 752 156 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

5

<400> 33

```

gccagcacia aaggtcctag cgtttttcca cttgccccat gttcaaggtc aacctccgaa      60
agtaccgcog ctcttggtg tctcgtaaaa gattattttc ccgaacctgt aactgtctcc      120
tggaactcog gcgcaactcac ttccggogta cataccttcc ccgctgtcct ccaatcttcc      180
ggtctctact cctgtcttc tgttgtaact gttccatcat cctcactcgg cacaaaaaca      240
tatacctgca acgttgatca caagccaagt aatacceaag ttgataagcg cgtcgaatcc      300
aaatacggtc cccctgccc cccatgtccc gctccacctg tggctggtec ctctgttttc      360
ctttttcccc ctaaacccaa agatacctc atgatttcca gaacccccga ggtcacctgc      420
gtcgtcgttg atgtaagcca agaagatccc gaagtccagt tcaattggta tgtagacggt      480
gttgaagtcc ataatgcaaa aacaaaaccc agagaggaac agtttaattc aacctatcgt      540
gtcgttagcg tactcacogt tcttcatcaa gactggctca atggaaaaga atataaatgt      600
aaagttagca acaaaggctt gccagttca atcgaaaaaa caattagcaa agccaaaggc      660
caacctogcg aaccccaagt ctataccttg ccccttctc aggaagaaat gacccaaaac      720
caagtttcac tcacatgcct cgtaaaagga ttctatccat cagacattgc agtagaatgg      780
gaatctaacg gccaacctga aaataattac aaaaccactc ctctgtcct cgattctgac      840
ggctcttttt tctttactc cagattgact gttgataaat cccgctggca ggaaggtaac      900
gttttttctt gttctgtgat gcacgaagcc ctccataaca gattcactca aaaatctctt      960
tctctctccc tgggcaaata a                                          981

```

10

<210> 34

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Sintético

<400> 34

ES 2 752 156 T3

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctect catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactotca ccatcagcag cctgcagtct 240  
 gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcac tatattaact ggcctctcac thtcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gotgcacat ctgtttcat thtcccgcca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gogaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

5 <210> 35  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 10 <400> 35

ES 2 752 156 T3

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

<210> 36  
 <211> 1362  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

ES 2 752 156 T3

<400> 36

gaagtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctggcaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgtag	cctctggatt	cacctttaat	gattatgcca	tgcactgggt	ccggcaagct	120
ccaggaagg	gcctggaatg	ggtctcagtt	attagttgga	atagtgatag	cataggctat	180
gcggaactctg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctccctgtat	240
ctgcaaatgc	acagtctgag	agctgaggac	acggccttgt	attactgtgc	aaaagataat	300
cactatgggt	cggggagtta	ttactactac	caatacggta	tggacgtctg	gggccaaggg	360
accacgggtca	ccgtctcctc	agccagcaca	aaaggtccta	gcgtttttcc	acttgcccca	420
tgttcaaggt	caacctccga	aagtaccgcc	gctcttggct	gtctcgtaaa	agattatttt	480
cccgaacctg	taactgtctc	ctggaactcc	ggcgcactca	cttccggcgt	acataccttc	540
cccgtgtctc	tccaatcttc	cggctctctac	tccctgtctt	ctggtgtcac	tgttccatca	600
tcctcactcg	gcacaaaaac	atatacctgc	aacgttgatc	acaagccaag	taataccaaa	660
gttgataagc	gcgtcgaate	caaatacggg	ccccctgcc	caccgtgcc	agcaccacct	720
gtggcaggac	catcagtctt	cctgttcccc	ccaaaaccca	aggacactct	catgatctcc	780
cggacccctg	aggtcacgtg	cgtgggtggg	gacgtgagcc	aggaagacc	cgaggtccag	840
ttcaactggg	acgtggatgg	cgtggagggt	cataatgcca	agacaaagcc	gcgggaggag	900
cagttcaaca	gcacgtaccg	tgtggtcagc	gtcctcaccg	tcctgcacca	ggactggctg	960
aacggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aacaaaggcc	tcccgtctc	catcgagaaa	1020
accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gagccacagg	tgtacaccct	gccccatcc	1080
caggaggaga	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc	tggtcaaagg	cttctacccc	1140
agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	1200
cctcccgtgc	tggactccga	cggtctcttc	ttcctctaca	gcaggctcac	cgtggacaag	1260
agcaggtggc	aggaggggaa	tgtcttctca	tgctccgtga	tgcattgaggc	tctgcacaac	1320
cactacacac	agaagtccct	ctccctgtct	ctgggtaaat	ga		1362

5

<210> 37  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Sintético

15

<400> 37

ES 2 752 156 T3

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

ES 2 752 156 T3

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr  
195 200 205

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg  
210 215 220

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro  
225 230 235 240

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
260 265 270

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

ES 2 752 156 T3

435

440

445

Leu Ser Leu Gly Lys  
450

5 <210> 38  
<211> 1350  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintético

<400> 38

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatacca tgcaactgggt ccggcaagct      120
ccagggaaagg gcctggagtg ggtctcaggc attagttgga atagtggtag tataggctat      180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtccctgtat      240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat      300
agtggctacg gtcactacta ctacggaatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc      360
gtgcctcag ccagcacaaa aggtcctagc gttttccac ttgccccatg ttcaaggcca      420
acctccgaaa gtaccgccc ccttggctgt ctcgtaaaag attatttcc cgaacctgta      480
actgtctcct ggaactccg cgcactcaet tccggcgtae atacctccc cgctgtcctc      540
caatcttccg gtctctactc cctgtcttct gttgtcaactg ttccatcatc ctcaactcggc      600
acaaaaacat atacctgcaa cgttgatcac aagccaagta ataccaaagt tgataagcgc      660
gtogaatcca aatacgggtc ccctgccc cggtgcccag caccacctgt ggcaggacca      720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag      780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac      840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggctg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggtcaccg tggacaagag caggtggcag     1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacag attcacacag     1320
aagtccctct ccctgtctct gggtaaataa                                     1350
    
```

ES 2 752 156 T3

<210> 39  
 <211> 1350  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

10

<400> 39

```

gaagtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatacca tgcactgggt cgggcaagct      120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag tataggctat      180
gcggaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtccctgtat      240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat      300
agtggctacg gtcactacta ctacggaatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc      360
gtgcgctcag ccagcacaaa aggtcctagc gtttttccac ttgccccatg ttcaaggcca      420
acctccgaaa gtaccgccgc tcttggctgt ctcgtaaaag attattttcc cgaacctgta      480
actgtctcct ggaactccgg cgcactcaet tccggcgtae ataccttccc cgctgtcctc      540
caatcttccg gtctctactc cctgtcttct gttgtcactg ttccatcacc ctcaactcggc      600
acaaaaacat atacctgcaa cgttgatcac aagccaagta ataccaaagt tgataagcgc      660
gtogaatcca aatacggtec ccctgcccc ccattgtccc ctccacctgt ggttggtccc      720
tctgttttcc tttttccccc taaacccaaa gataccctca tgatttccag aacccccgag      780
gtcacctcgc tcgtcgttga tgtaagccaa gaagatcccg aagtccagtt caattggtat      840
gtagacggtg ttgaagtcca taatgcaaaa acaaaacca gagaggaaca gtttaattca      900
acctatcgtg tcgttagcgt actcacggtt cttoatcaag actggctcaa tggaaaagaa      960
tataaatgta aagttagcaa caaaggctctg ccagttcaa tcgaaaaaac aattagcaaa     1020
gccaaaggcc aacctcgcga accccaagtc tataccttgc ccccttctca ggaagaaatg     1080
acaaaaaacc aagtttcaet cacatgcctc gtaaaaggat tctatccatc agacattgca     1140
gtagaatggg aatctaacgg ccaacctgaa aataattaca aaaccactcc tectgtcctc     1200
gattctgacg gctctttttt cctttactcc agattgactg ttgataaatc ccgctggcag     1260
gaaggtaacg ttttttcttg ttctgtgatg cacgaagccc tccataacag attcactcaa     1320
aaatctcttt ctctctccct gggcaaataa                                     1350
    
```

<210> 40  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Sintético

ES 2 752 156 T3

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
 130 135 140  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
 195 200 205  
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys  
 210 215 220  
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro  
 225 230 235 240

ES 2 752 156 T3

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 435 440 445

Lys

- <210> 41
- <211> 1371
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintético

10

ES 2 752 156 T3

<400> 41

gaagtacagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggatt cacctttaat gattatgcc a tgactgggt ccggaagct 120  
 ccaggaagc gcctggaatg ggtctcagtt attagtgg a atagtgatag cataggctat 180  
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
 ctgcaaatgc acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat 300  
 cactatgggt cggggagtta ttactactac caatacggta tggacgtctg gggccaaggg 360  
 accaocgtca cgtctcctc agcctccacc aagggccat cggctctccc cctggcacc 420  
 tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 480  
 cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc 540  
 ccggctgtcc tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc 600  
 agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag 660  
 gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgcc accgtgccc 720  
 gcaccacctg tggcaggacc atcagtcttc ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc 780  
 atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc 840  
 gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg 900  
 cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag 960  
 gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 1020  
 atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg 1080  
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140  
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200  
 aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggtccttct tcctctacag caagctcacc 1260  
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaa gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1320  
 ctgcacaacc actacacgca gaagtcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1371

5 <210> 42  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 42

15           Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
               1                               5                               10                               15

ES 2 752 156 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Val Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr  
 100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120 125

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 130 135 140

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 165 170 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 260 265 270

ES 2 752 156 T3

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
 325 330 335

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 43  
 <211> 1359  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 43

5

10

ES 2 752 156 T3

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatacca tgcaactgggt ccggcaagct 120  
 ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag tataggctat 180  
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtccctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat 300  
 agtggctacg gtcactacta ctacggaatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc 360  
 gtcgcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420  
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480  
 acgggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540  
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 600  
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660  
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc accacctgtg 720  
 gcaggaccat cagtcttctt gttcccccca aaacccaagg acactctcat gatctcccgg 780  
 acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc 840  
 aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900  
 ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac 960  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc 1020  
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg 1080  
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140  
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct 1200  
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260  
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaacaga 1320  
 ttcacgcaga agtccctctc cctgtctccg ggtaaata 1359

<210> 44  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

10

<400> 44



ES 2 752 156 T3

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val  
225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
290 295 300

ES 2 752 156 T3

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 45  
<211> 330  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Sintético

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

ES 2 752 156 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

ES 2 752 156 T3

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 46  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

ES 2 752 156 T3

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 47  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

5

10

ES 2 752 156 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

ES 2 752 156 T3

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 48  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 48

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

ES 2 752 156 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 49  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 49

5

10

ES 2 752 156 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

ES 2 752 156 T3

50						55										60
Leu 65	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	80
					70					75						
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85					90					95		
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	
			100					105					110			
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
		115					120					125				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
130						135					140					
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
145					150					155					160	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
				165					170					175		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
			180					185					190			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
		195					200					205				
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
	210					215					220					
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
225					230					235					240	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				245					250					255		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
			260					265					270			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
		275					280					285				
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
	290					295					300					

ES 2 752 156 T3

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

5 <210> 50  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 50

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 1 5 10

15 <210> 51  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 51

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
 1 5

25 <210> 52  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 52

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
 1 5

35 <210> 53  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintético  
 <400> 53

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 1 5 10 15

Pro Pro Val Ala  
 20

45 <210> 54

ES 2 752 156 T3

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintético

<400> 54

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val  
 1 5 10 15

10 Ala

<210> 55  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

20 <400> 55

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 1 5 10 15

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln  
 20 25 30

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 35 40 45

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr  
 50 55 60

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 65 70 75 80

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile  
 85 90 95

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 100

25 <210> 56  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintético

<400> 56

ES 2 752 156 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 100 105

<210> 57  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

10

<400> 57

ES 2 752 156 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe  
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 100 105

<210> 58  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

10

<400> 58

ES 2 752 156 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
 1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 100 105

<210> 59  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

10

<400> 59

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
 1 5 10 15

ES 2 752 156 T3

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe  
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 100 105

<210> 60  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val

<210> 61  
 <211> 98

ES 2 752 156 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintético

<400> 61

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

Arg Val

10 <210> 62  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintético

20 <400> 62

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

ES 2 752 156 T3

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

5 <210> 63  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 63  
 ttcgcgagc ttaggttat gccagggggg acgggtggca cgggtcgtgg tggacaccgt 60

15 <210> 64  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

<400> 64  
 aagcttatac tcgagctcta gattgggaac cgggtctct 40

25 <210> 65  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintético

<400> 65  
 cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaa 58

35 <210> 66  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintético

<400> 66  
 tgtgtctca gggagagga cagagacca ttactcgcc ggcg 44

45 <210> 67  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Sintético

55 <400> 67  
 ctgggttta gaacactgtt ttgagtgtgt acgggtggca cgggtcgtgg tggacaccgt 60

ES 2 752 156 T3

<210> 68  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
  
 10 <400> 68  
 aaatcttggt acaaaactca cacatgccca ccgtgccag caccacctg g 51  
  
 <210> 69  
 <211> 54  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 20  
 <400> 69  
 gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag ccccgagaac cacaggtgta cacc 54  
  
 <210> 70  
 <211> 54  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 30  
 <400> 70  
 ctcttttggt agaggttctg gttcccgtc ggggctctg gtgtccacat gtgg 54  
  
 <210> 71  
 <211> 39  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
 40  
 <400> 71  
 ctcagggag agggacagag gccatttac tcgccggcg 39  
 45  
 <210> 72  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Sintético  
  
 <400> 72  
 55 gctgacagac taacagactg 20  
  
 <210> 73  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintético  
  
 <400> 73  
 65 atacattata cgaagttata ccggtgta 26

ES 2 752 156 T3

5 <210> 74  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

10 <400> 74

```

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1           5           10           15

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
           20           25           30

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
           35           40           45

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
50           55           60

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
65           70           75           80

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
           85           90           95

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           100           105
  
```

15 <210> 75  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

<400> 75



## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento o la mejora de un cáncer de linfocitos B en un sujeto, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico conectado a cada uno del primer y segundo dominio de unión a antígeno, en donde el dominio Fc quimérico comprende:
- (a) una secuencia de aminoácidos de la bisagra superior de IgG 1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración de EU);
  - (b) una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana que comprende PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) de las posiciones 228 a 236 (numeración de EU);
  - (c) un dominio CH1 de IgG1 humana y un dominio CH3 de IgG1 humana, o un dominio CH1 de IgG4 humana y un dominio CH3 de IgG4 humana; y
  - (d) una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración de EU);
- en donde el anticuerpo biespecífico presenta una mayor afinidad de unión por FcγRIIA humano con respecto a FcγRIIB humano, y presenta poca o ninguna afinidad de unión detectable por FcγRI humano y FcγRIII humano, medido en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.
2. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en: linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma linfoblástico de linfocitos B, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, tricoleucemia y linfoma de Burkitt.
3. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el cáncer de linfocitos B es linfoma no Hodgkin.
4. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en donde el sujeto padece un tumor que es resistente o que no es completamente reactivo a (a) una terapia mono-específica anti-CD20 sola, o (b) una monoterapia con rituximab; y/o en donde el sujeto ha recibido una terapia con anticuerpo mono-específico anti-CD20 al menos 1 día a 1 año antes de la administración del anticuerpo biespecífico.
5. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo:
- (a) presenta citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*;
  - (b) presenta ADCC insignificante o no detectable;
  - (c) presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) disminuida en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido en un ensayo de citotoxicidad *in vitro*;
  - (d) presenta una citotoxicidad de menos del 50 %, detectado por medición de la lisis celular en un ensayo *in vitro*;
  - (e) presenta CDC insignificante o no detectable;
  - (f) induce una disminución de la destrucción mediada por linfocitos T de células que portan receptores Fc, tales como linfocitos NK o macrófagos, en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre; o
  - (g) induce una disminución de la destrucción de linfocitos T mediada por células portadoras de receptor de Fc, tales como linfocitos NK o macrófagos, en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.
6. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo biespecífico comprende
- (a) una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 53); o
  - (b) una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 54).
7. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la SEQ ID NO: 10, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la SEQ ID NO: 18.
8. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 humano comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende la SEQ ID NO: 2, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende la SEQ ID NO: 18.

- 5 9. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el primer dominio de unión a antígeno (A1) que se une específicamente a CD3 humano comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3), en donde
- (i) A1-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;
  - (ii) A1-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;
  - (iii) A1-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16;
  - 10 (iv) A1-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;
  - (v) A1-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y
  - (vi) A1-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.
- 15 10. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 9, en donde el segundo dominio de unión a antígeno (A2) que se une específicamente a CD20 humano comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3), en donde
- (i) A2-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
  - 20 (ii) A2-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;
  - (iii) A2-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;
  - (iv) A2-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;
  - (v) A2-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y
  - 25 (vi) A2-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.
- 25 11. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.
- 30 12. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.
- 35 13. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30.
- 40 14. Un anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un dominio Fc quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32.

Construcción de bisagra química

		Bisagra superior										Bisagra inferior														
		216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227													
Numeración de EU de IgG1																										
Numeración de Kabat de IgG1		226	227	228	232 <sup>a</sup>	233 <sup>a</sup>	234 <sup>a</sup>	235	236	237	238	239	240													
IgG1		E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P													
		IgG2																								
		E	S	K	Y	G	--	--	--	P	P	C	P													
Numeración de EU de IgG4		216	217	218	219 <sup>b</sup>	220 <sup>b</sup>				224	225	226	227													
Numeración de Kabat de IgG4		226	227	228	229	230				237	238	239	240													
		Numeración de EU de IgG2																								
		228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240												
		Numeración de Kabat de IgG2																								
		241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255										

- significa número correspondiente no informado

-- significa que no hay un aminoácido correspondiente

<sup>a</sup> numeración de acuerdo con la última Tabla Científica del IMGT actualizado (IMGT<sup>®</sup>, el International ImMunoGeneTics information system<sup>®</sup>, [http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IgHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHGnber.html), creado: 17 de mayo de 2001, última actualización: 10 de enero de 2013)

<sup>b</sup> numeración de acuerdo con el índice EU como se informa en Kabat, E.A. *et al.* Sequences of Proteins of Immunological interest. 5ª edición. US Department of Health and Human Services, publicación del NIH n.º 91-3242 (1991)

FIG. 1







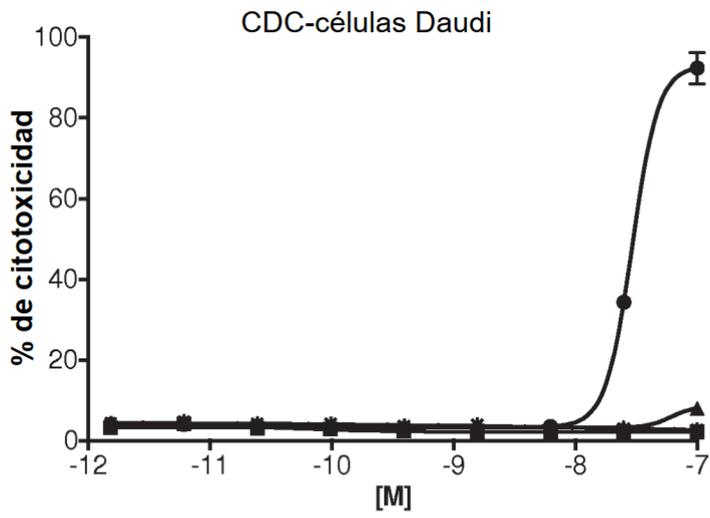


FIG. 5A

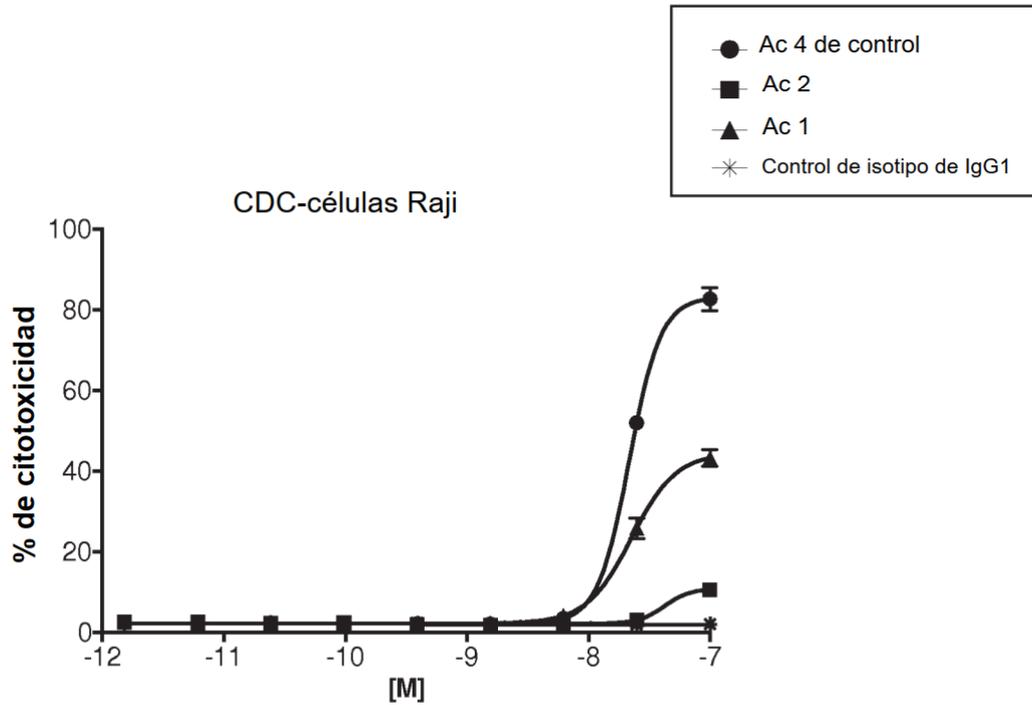


FIG. 5B

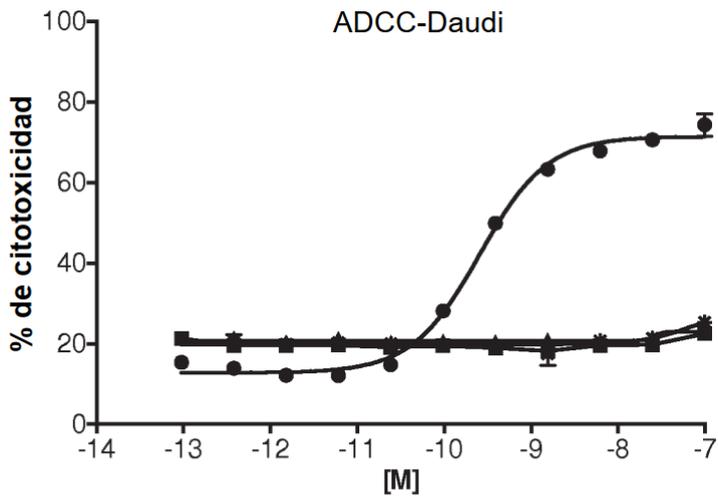


FIG. 6A

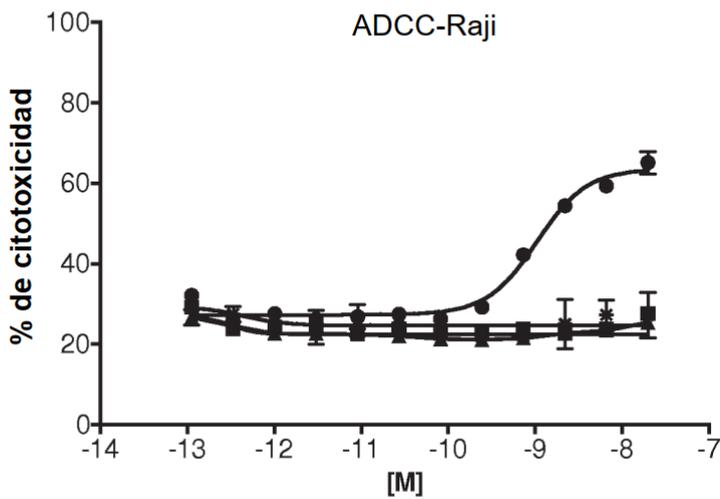
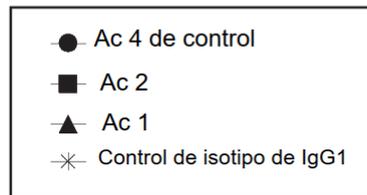
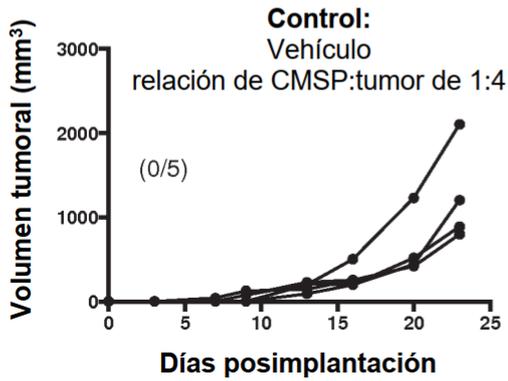
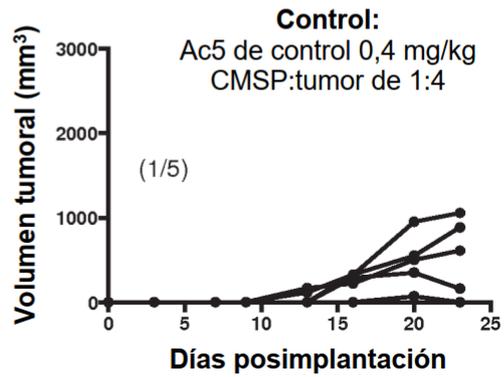


FIG. 6B

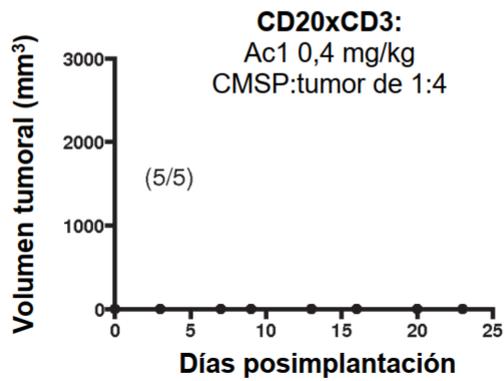
**Tratamiento con Ac1 o de control de ratones NSG a los que se les implantó células tumorales Raji y CMSP**



**FIG. 7A**

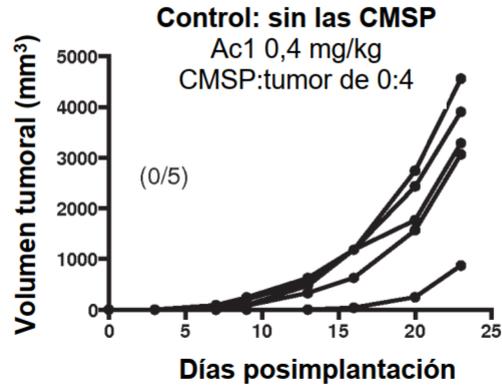


**FIG. 7B**



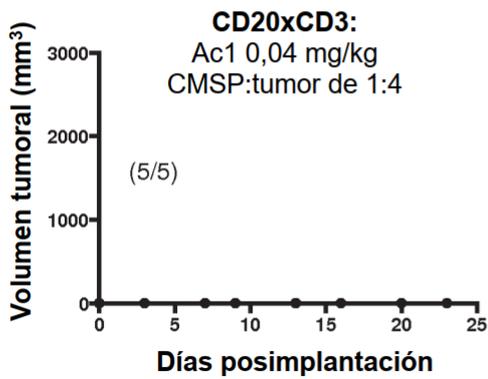
**FIG. 7C**

**Tratamiento con Ac1 de ratones NSG a los que se les implantó células tumorales Raji - sin control de CMSP**

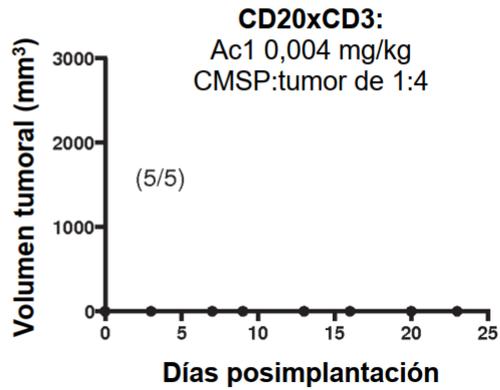


**FIG. 7D**

**Tratamiento con Ac1 de ratones NSG a los que se les implantó células tumorales Raji y CMSP**

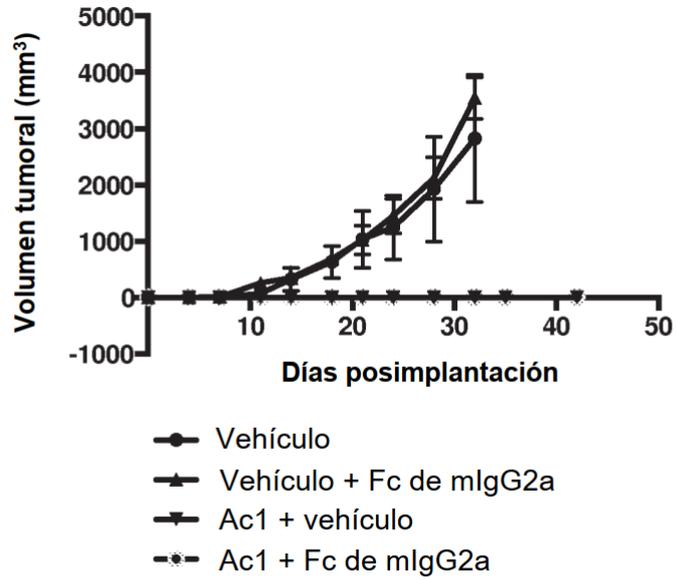


**FIG. 7E**

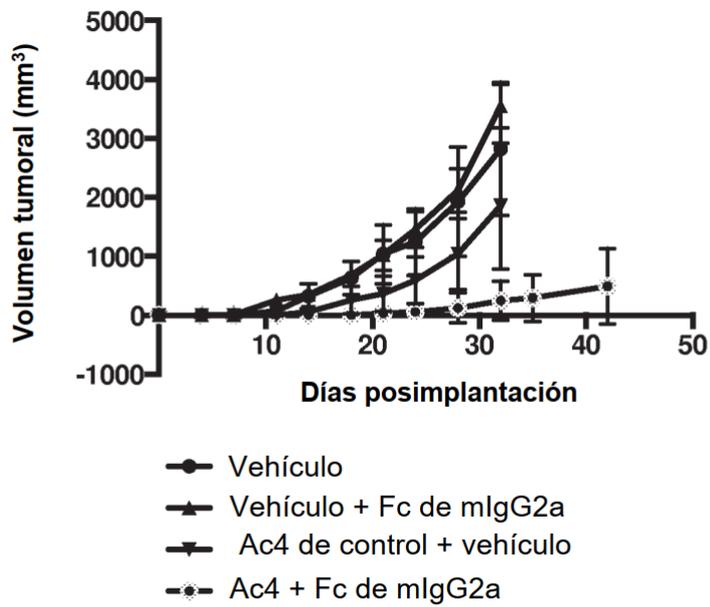


**FIG. 7F**

**Ratones NSG con suplemento de Fc de mlgG2a**



**FIG. 8A**



**FIG. 8B**

Tratamiento de tumores establecidos de ~200-400 mm<sup>3</sup> en ratones NSG con anticuerpo biespecífico CD3xCD20

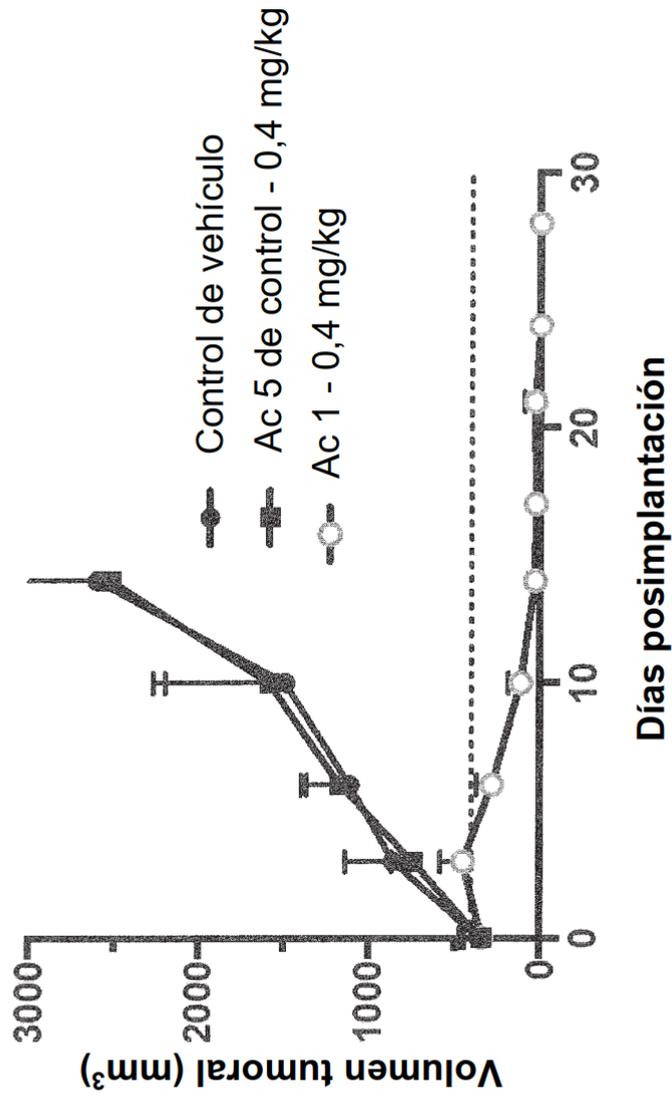


Fig. 9

Tratamiento de tumores establecidos de ~500-900 mm<sup>3</sup> en ratones NSG con anticuerpo biespecifico CD3xCD20

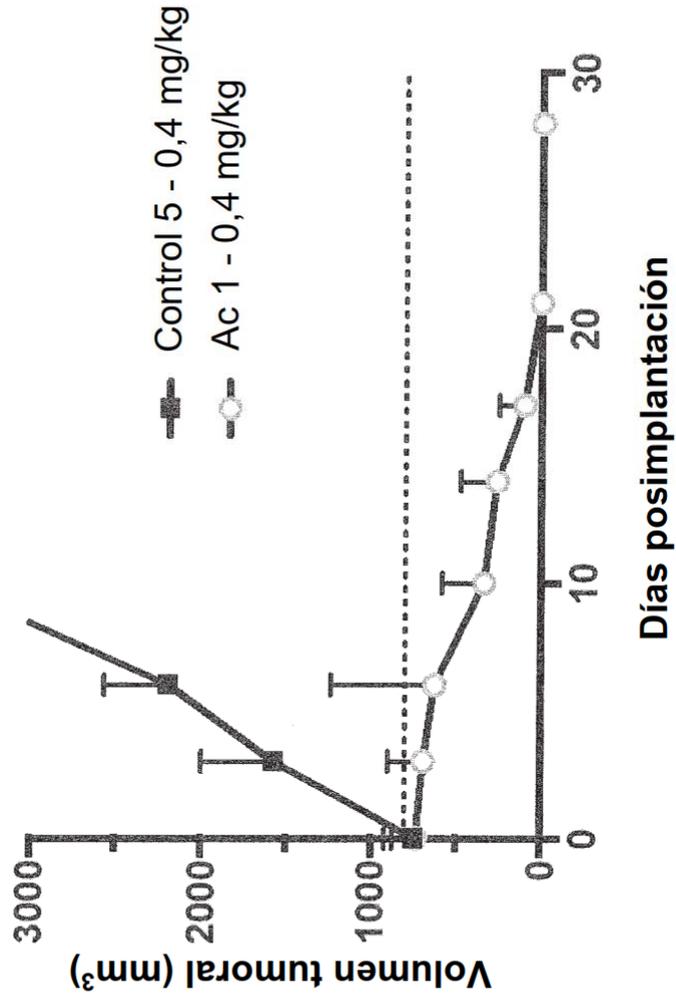
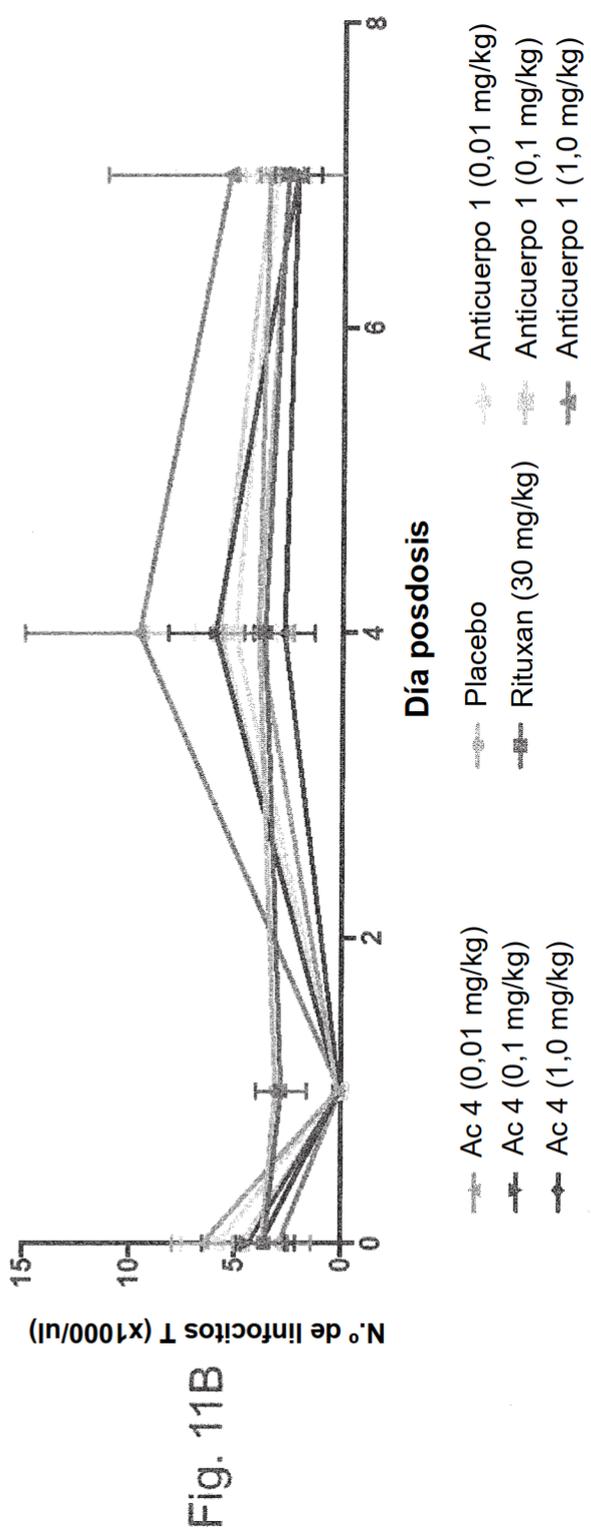
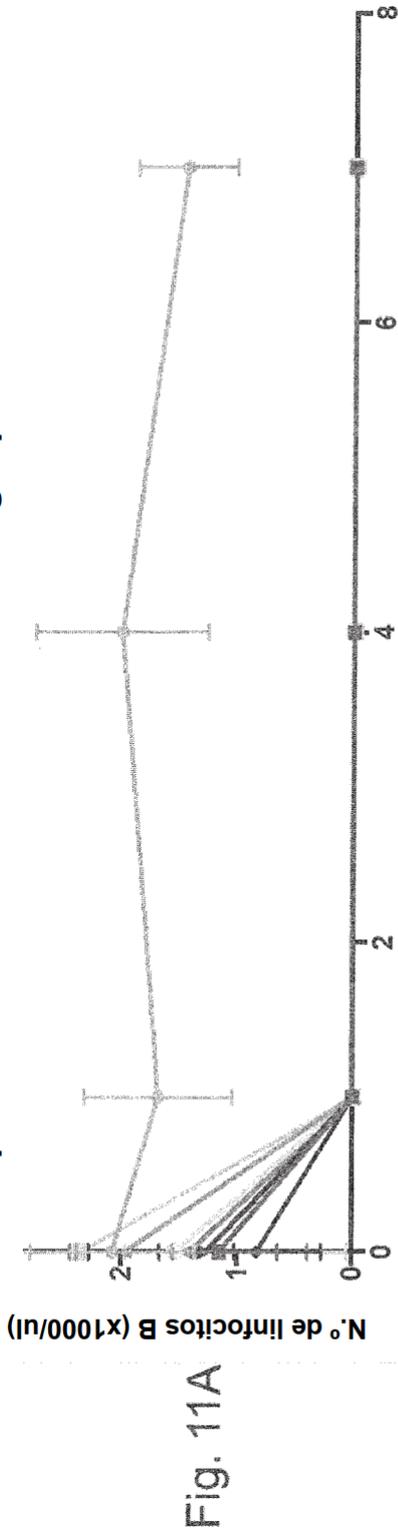


Fig. 10

Los anticuerpos monoespecíficos para CD20 y biespecíficos CD3xCD20 muestran empobrecimiento de linfocitos T en sangre periférica



de linfocitos T circulantes a largo plazo

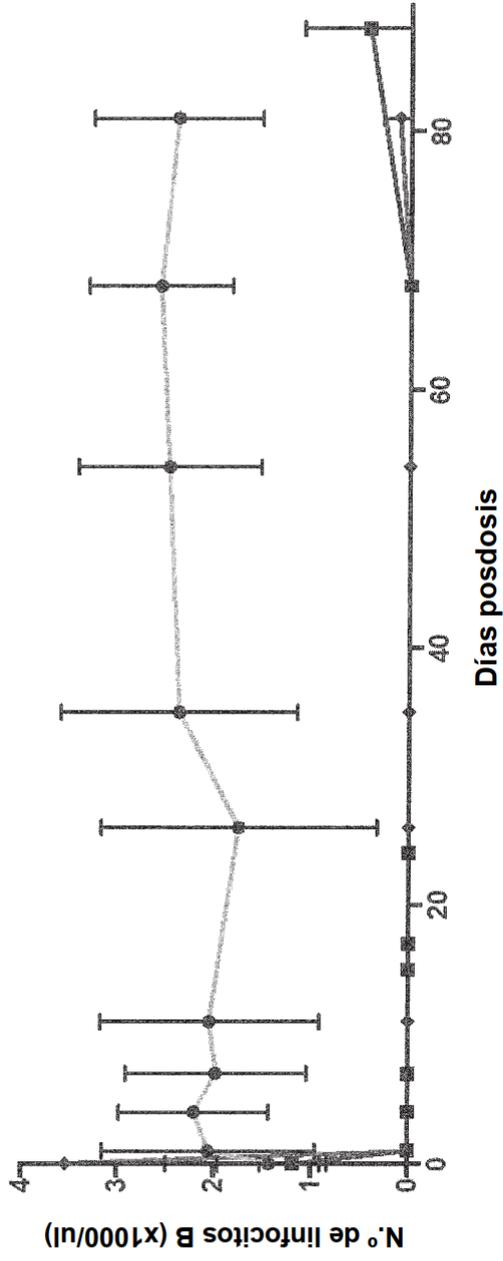


Fig. 12A

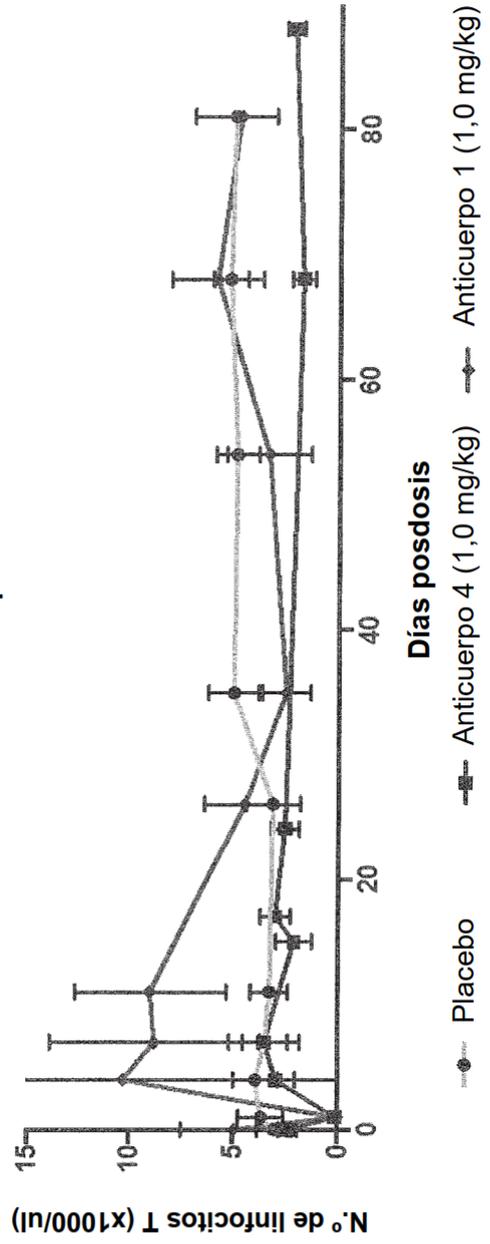
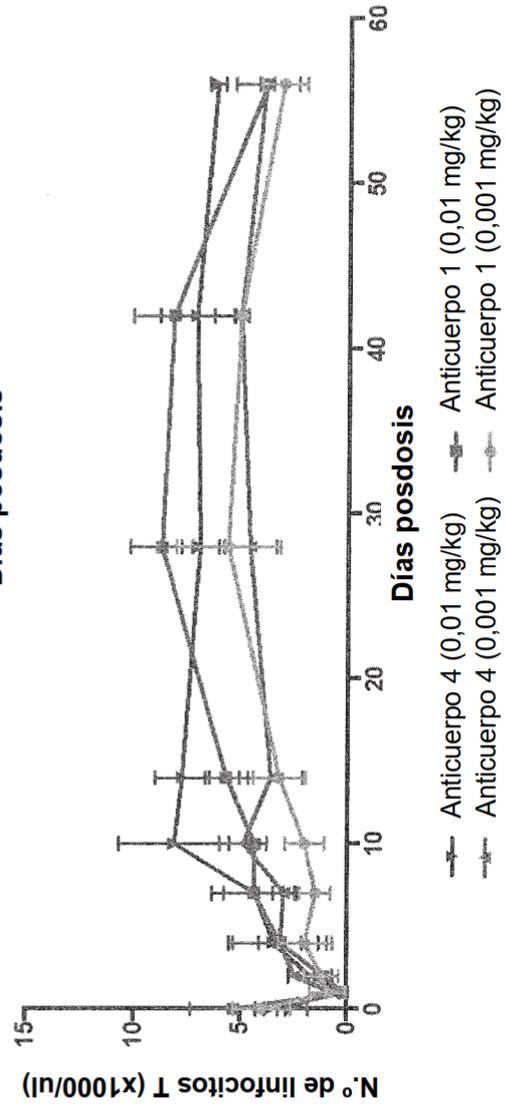
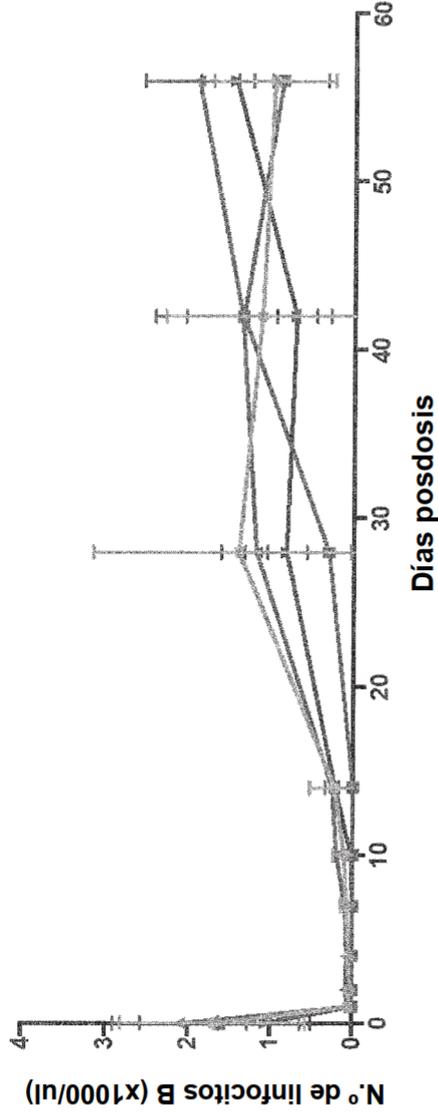
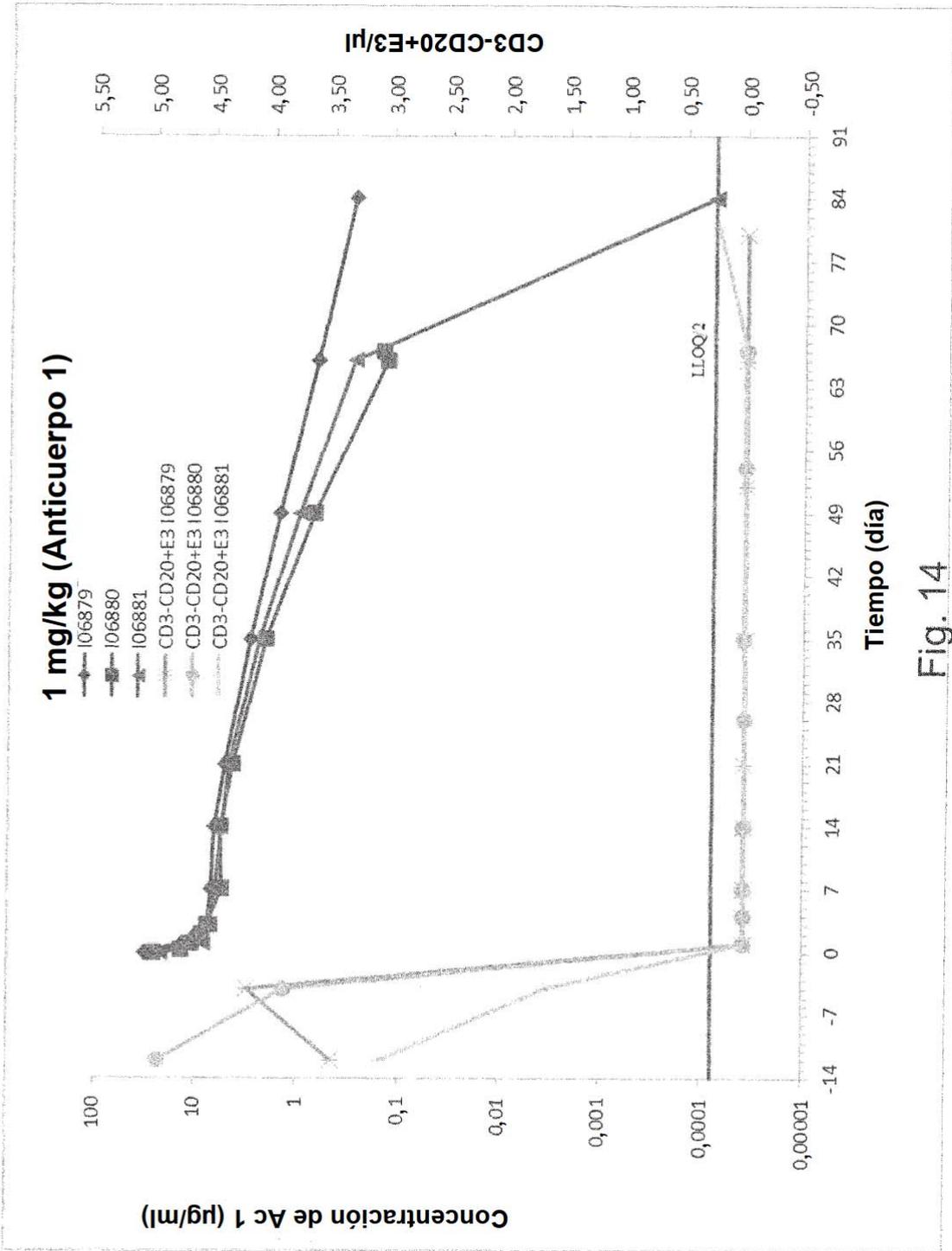


Fig. 12B

Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 muestran empobrecimiento de linfocitos T en sangre periférica a bajos niveles de dosis



**La recuperación de linfocitos B se correlaciona con la pérdida de niveles de Ac biespecíficos circulantes detectables**



**Fig. 14**

La recuperación de linfocitos B se correlaciona con la pérdida de niveles de Ac biespecíficos circulantes detectables

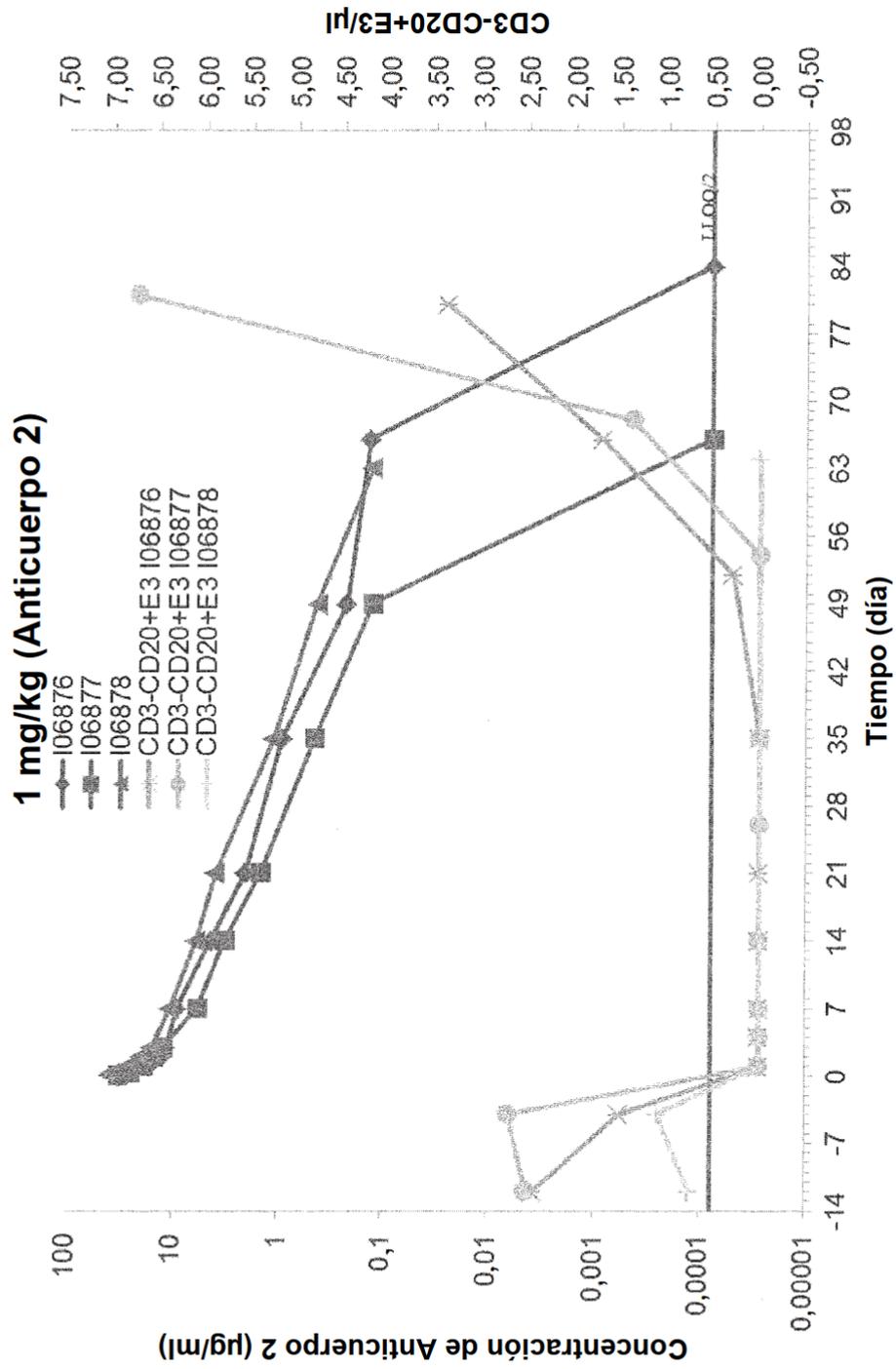


Fig. 15

**La recuperación de linfocitos B se correlaciona con la pérdida de niveles de Ac  
biespecíficos circulantes detectables**

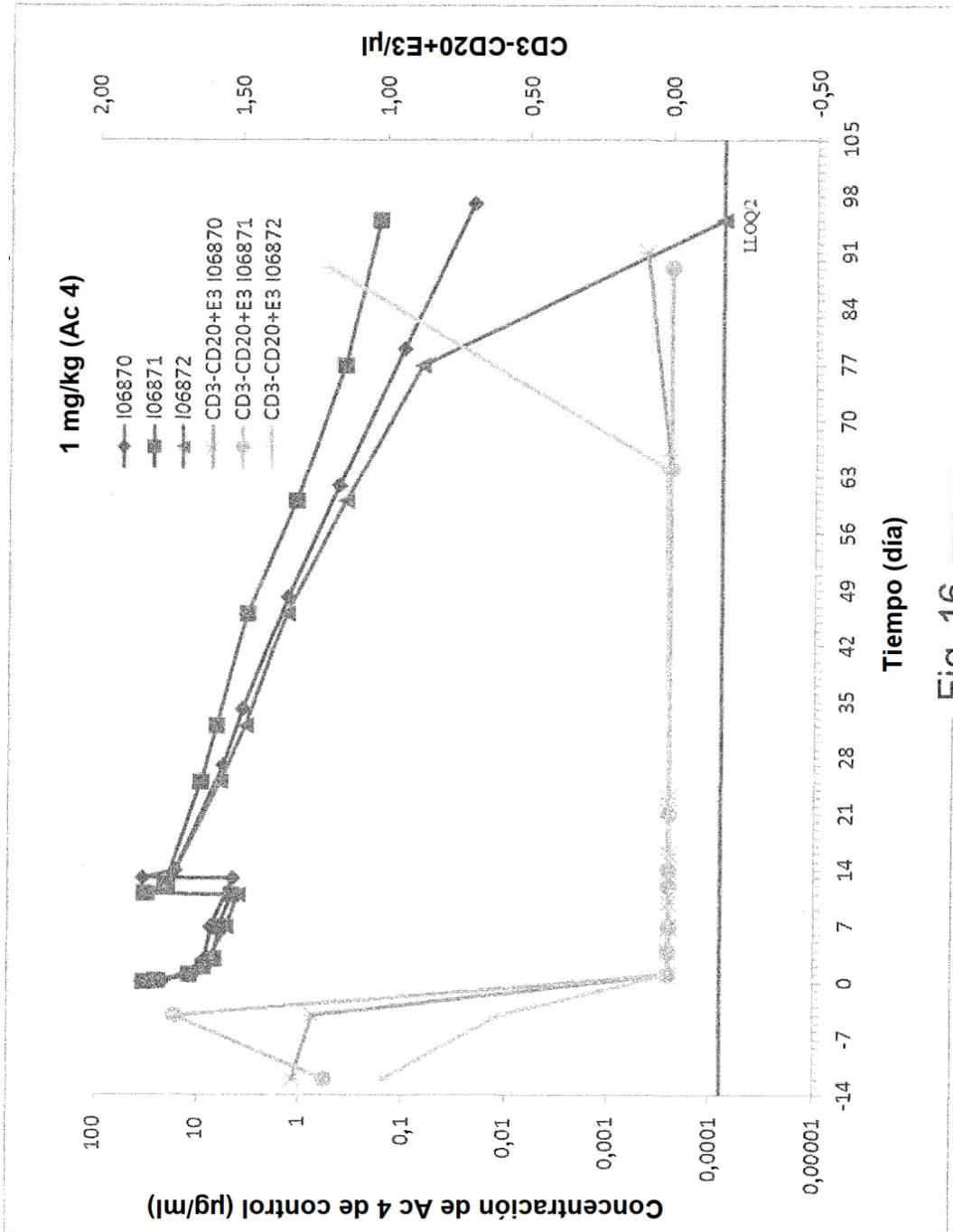


Fig. 16

Los biespecíficos CD3xCD20 muestran la capacidad de empobrecer linfocitos B en órganos linfocíticos



Fig. 17A

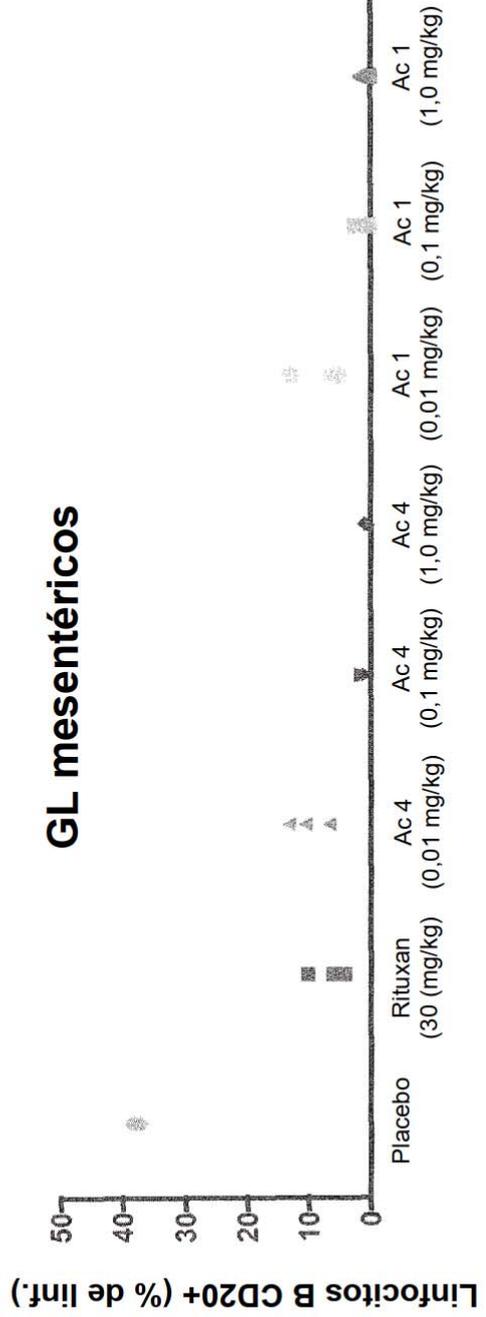


Fig. 17B

Los biespecíficos CD3xCD20 inducen la proliferación de linfocitos T *in vitro*

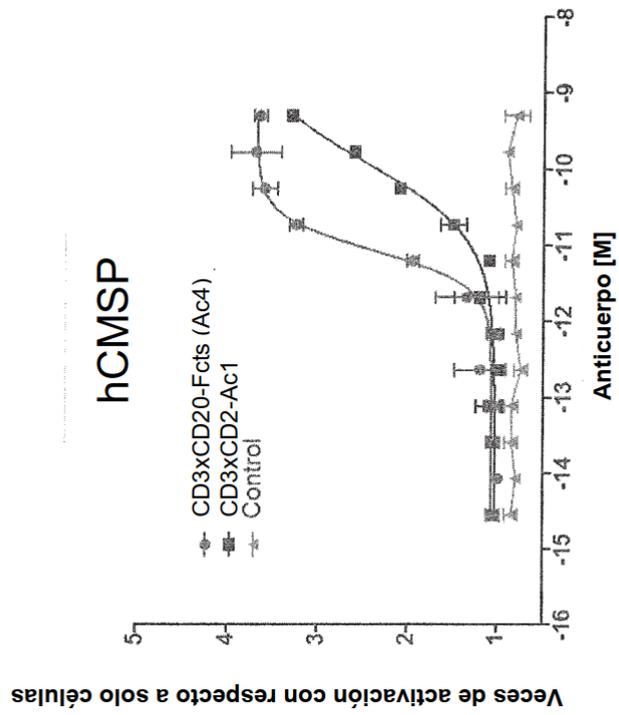


Fig. 18A

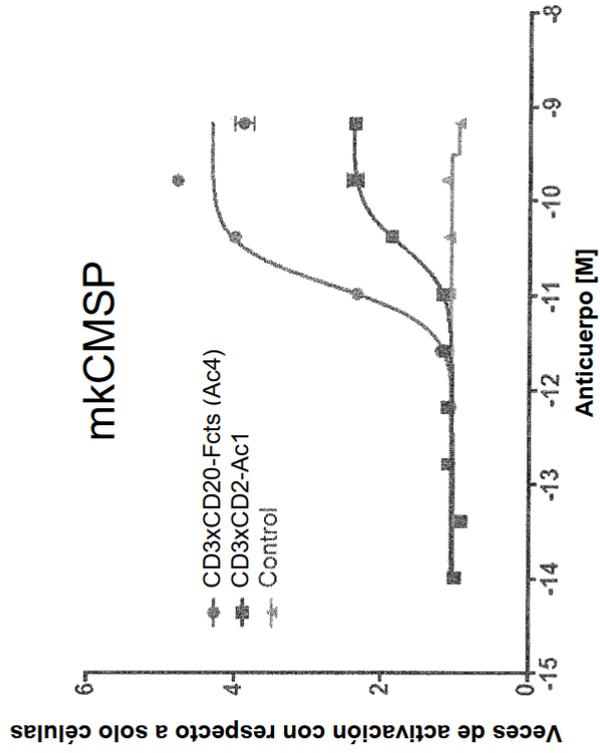


Fig. 18B

**Los biespecíficos CD3xCD20 median la destrucción celular mediante linfocitos T activados en un bioensayo *in vitro***

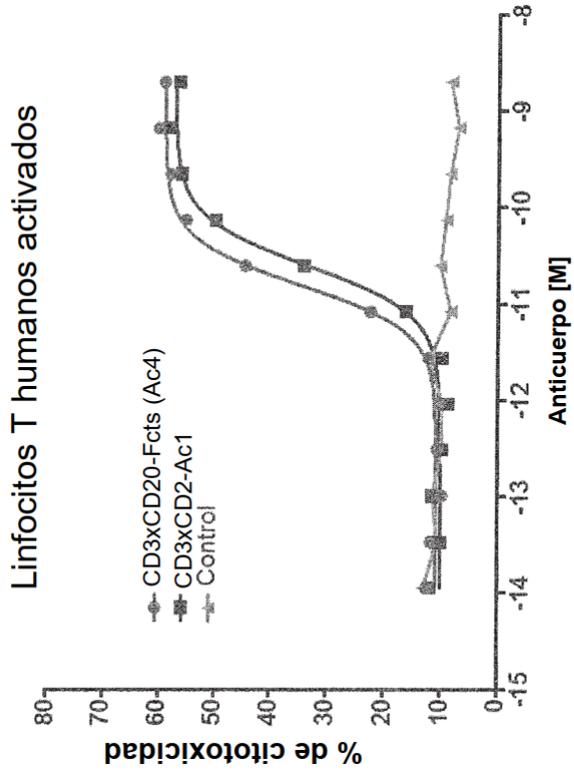


FIG. 19A

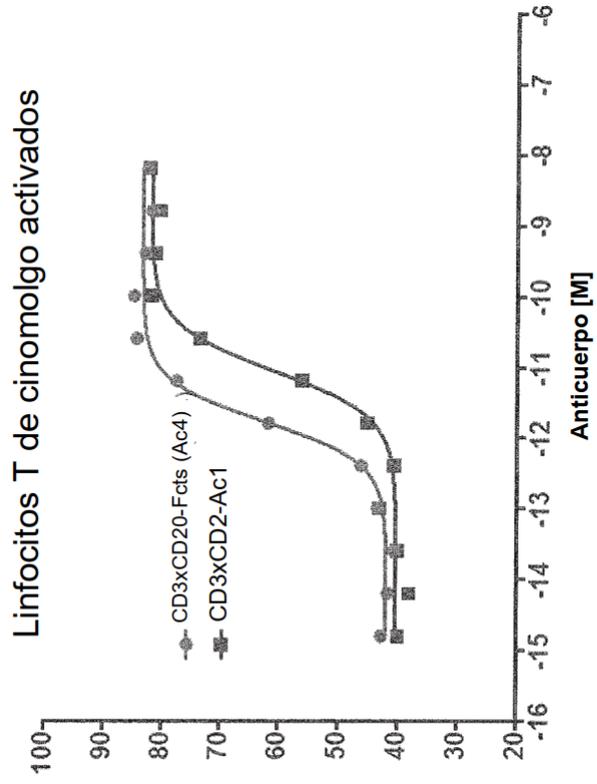
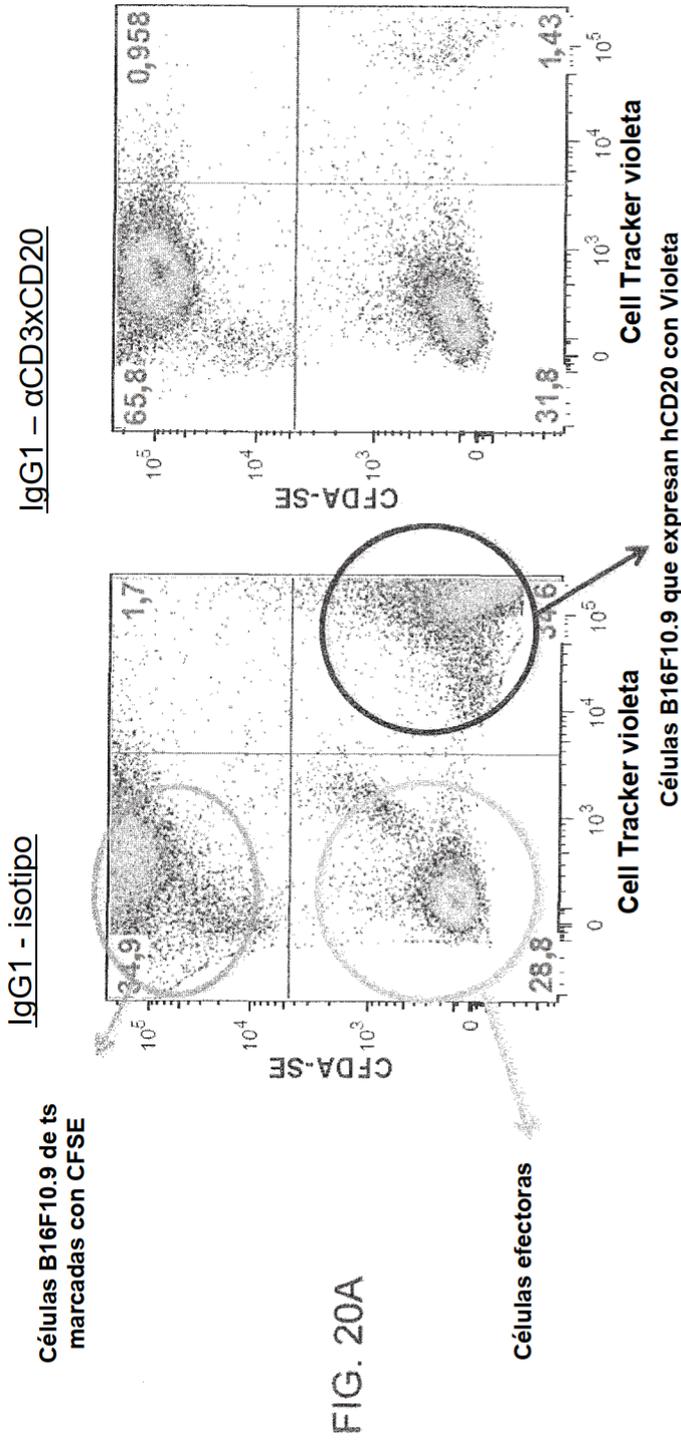
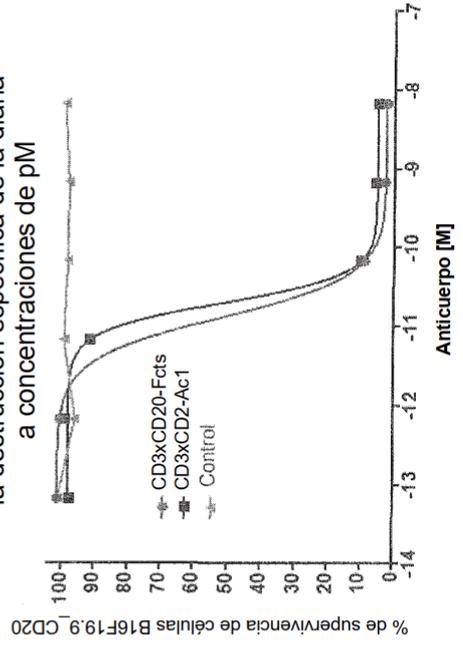


FIG. 19B



Biespecíficos CD20xCD3 dan como resultado la destrucción específica de la diana a concentraciones de pM



### Los marcadores de activación de linfocitos T se inducen por el tratamiento de Ac biespecífico

La regulación al alza de CD69 en un ensayo de citotoxicidad de 48 horas dirigido a células B16F10.9\_CD20

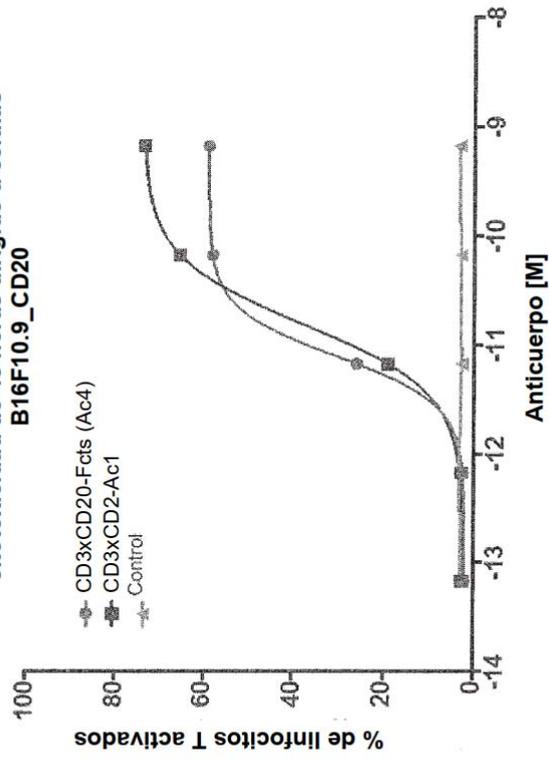


FIG. 21

Los biespecíficos CD3xCD20 inducen el agrupamiento de linfocitos T con células diana

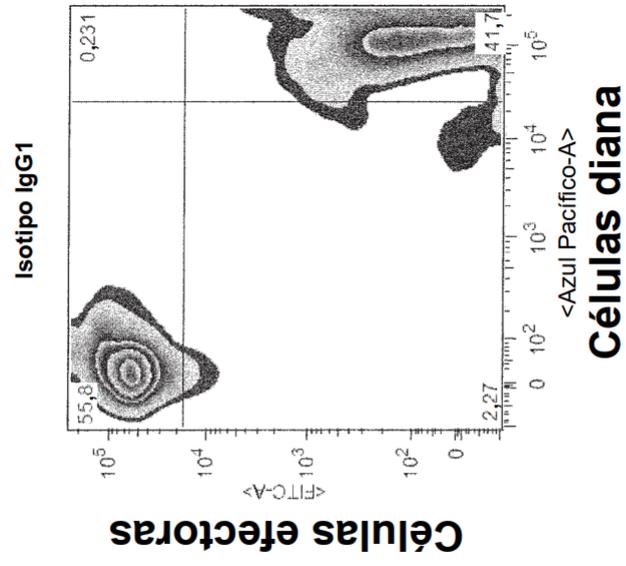


FIG. 22A

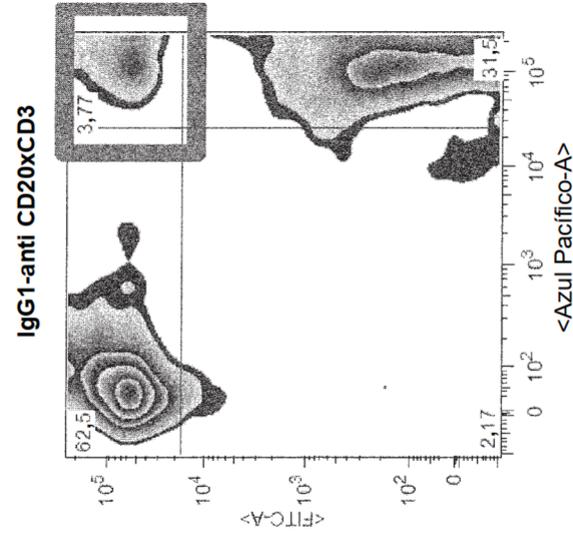
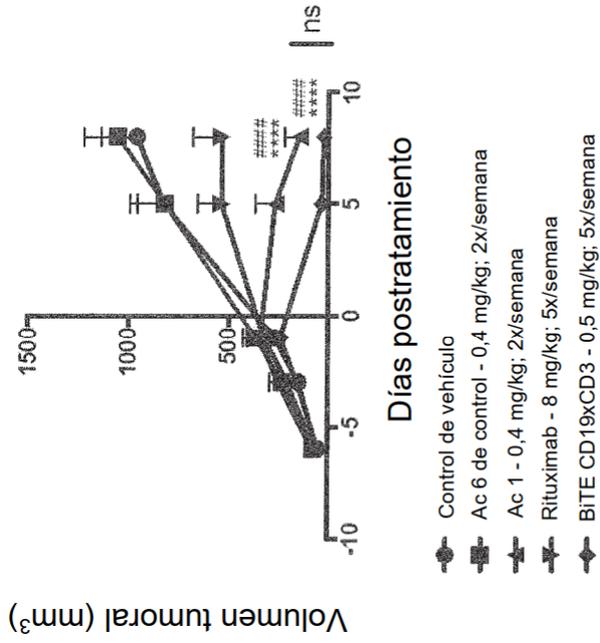


FIG. 22B

## Tratamiento en ratones NSG con tumores Raji establecidos



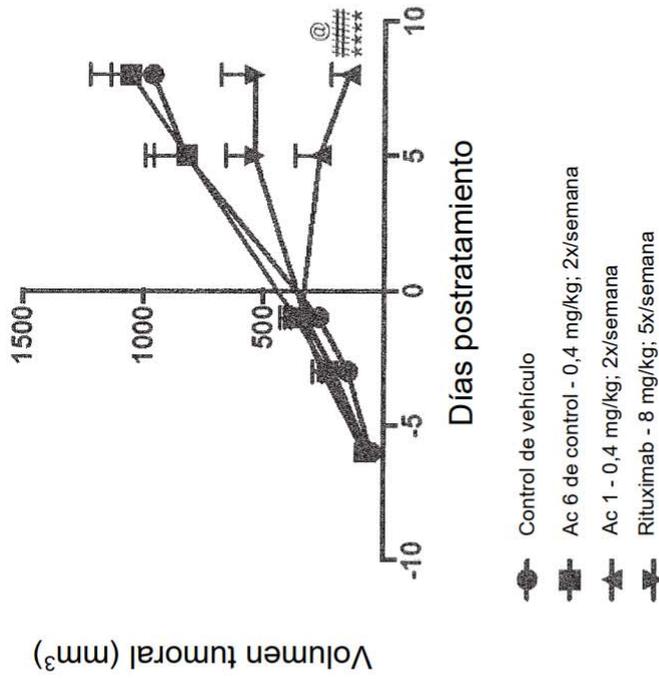
\*\*\*\*- en comparación con el control de vehículo; ####- en comparación con Ac 6 de control; @ - en comparación con rituximab;

ns - no significativo

Los datos representan los datos combinados de n=4-6 ratones por grupo. Los datos se expresan como la media (ETM) y se analizaron utilizando análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas post hoc para analizar efectos significativos (Tukey para ANOVA bilateral). Para analizar los datos mediante ANOVA bilateral se excluyeron de esta gráfica combinada dos ratones en el grupo de BiTE CD19 y un ratón del grupo de Ac 1 debido a muerte prematura.

FIG. 23

Tratamiento en ratones NSG con tumores Raji establecidos



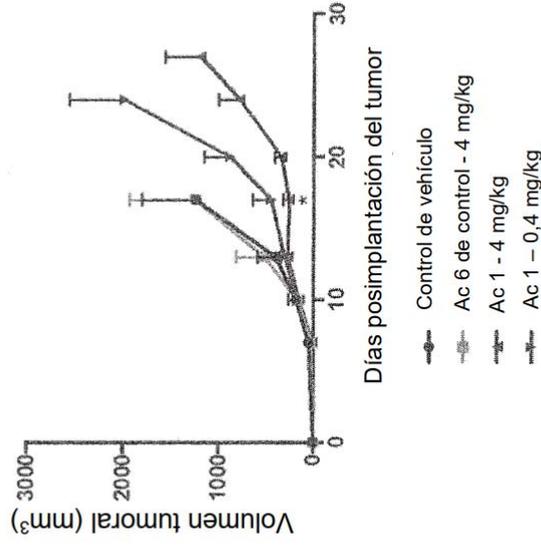
\*\*\*\*\_ en comparación con el control de vehículo; ###- en comparación con Ac 6 de control;

@ - en comparación con rituximab

Los datos representan los datos combinados de n=4-6 ratones por grupo. Los datos se expresan como la media (ETM) y se analizaron utilizando análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas post hoc para analizar efectos significativos (Tukey para ANOVA bilateral). Para analizar los datos mediante ANOVA bilateral se excluyó de esta gráfica compuesta un ratón del grupo con Ac 1 debido a muerte prematura.

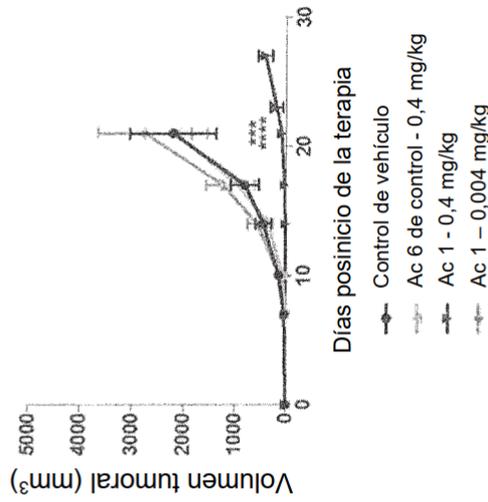
FIG. 24

**Tratamiento en ratones de hCD3 a los que se les implantaron tumores CD20/B16F10.9**



\* - en comparación con vehículo y anticuerpo de control  
 Los datos representan los datos combinados de n=5 ratones por grupo.  
 Los datos se expresan como la media (ETM) y se analizaron utilizando análisis de la varianza (ANOVA).

FIG. 25B



\*\*\*\* - en comparación con vehículo; \*\*\* - en comparación con control de Ac 6 de control;  
 Los datos representan los datos combinados de n=5 ratones por grupo. Los datos se expresan como la media (ETM) y se analizaron utilizando análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas post hoc para analizar efectos significativos (Tukey para ANOVA bilateral).

FIG. 25A