

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 207**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2014 PCT/EP2014/053490**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14131712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014 E 14708507 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2961771**

54 Título: **Moléculas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T biespecíficas específicas para CD3 y CEA**

30 Prioridad:

26.02.2013 EP 13156686

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

24.07.2020

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 10
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**BACAC, MARINA;
HOFER, THOMAS;
HOSSE, RALF;
NEUMANN, CHRISTIANE;
KLEIN, CHRISTIAN;
MOESSNER, EKKEHARD;
UMANA, PABLO y
WEINZIERL, TINA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 775 207 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

Moléculas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T biespecíficas específicas para CD3 y CEA

5 **Campo de la invención**

La presente invención en general se refiere a moléculas de unión a antígeno biespecíficas para activar linfocitos T. Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas, y vectores y células huésped que comprenden dichos polinucleótidos. La invención se refiere además a procedimientos para producir dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas, y a procedimientos de uso de dichas moléculas de unión a antígeno biespecíficas en el tratamiento de enfermedad.

Antecedentes

15 La destrucción selectiva de una célula individual o un tipo de célula específico a menudo es deseable en una variedad de entornos clínicos. Por ejemplo, un objetivo principal del tratamiento del cáncer es destruir específicamente las células tumorales, dejando las células y tejidos sanos intactos y sin daños.

20 Una forma atractiva de lograr esto es induciendo una respuesta inmunitaria contra el tumor, para hacer que las células efectoras inmunitarias tales como los linfocitos citolíticos naturales (NK) o los linfocitos T citotóxicos (CTL) ataquen y destruyan las células tumorales. Los CTL constituyen las células efectoras más potentes del sistema inmunitario; sin embargo, no se pueden activar por el mecanismo efector mediado por el dominio Fc de anticuerpos terapéuticos convencionales.

25 A este respecto, los anticuerpos biespecíficos diseñados para unirse con un "brazo" a un antígeno de superficie en células diana, y con el segundo "brazo" a un componente invariante activador del complejo receptor de linfocitos T (TCR), se han vuelto de interés en los últimos años. La unión simultánea de un anticuerpo de este tipo a ambas de sus dianas forzará una interacción temporal entre la célula diana y el linfocito T, provocando la activación de cualquier linfocito T citotóxico y la posterior lisis de la célula diana. Por tanto, la respuesta inmunitaria se redirige a las células diana y es independiente de la presentación antigénica de péptidos por la célula diana o la especificidad del linfocito T como sería pertinente para la activación restringida para MHC normal de CTL. En este contexto, es crucial que los CTL solo se activen cuando una célula diana les presente el anticuerpo biespecífico, es decir, se imite la sinapsis inmunológica. Son en particular deseables los anticuerpos biespecíficos que no requieren precondicionamiento o coestimulación de linfocitos para provocar lisis eficaz de células diana.

35 Se han desarrollado varios formatos de anticuerpos biespecíficos e investigado su idoneidad para inmunoterapia mediada por linfocitos T. De estos, las denominadas moléculas BiTE (captadoras de linfocitos T biespecíficos) se han caracterizado muy bien y ya se han mostrado prometedoras en el ámbito clínico (revisado en Nagorsen y Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)). Las BiTE son moléculas scFv en tándem en las que dos moléculas scFv se fusionan por un conector flexible. Otros formatos biespecíficos que se evalúan para el acoplamiento de linfocitos T incluyen diacuerpos (Holliger *et al.*, *Prot Eng* 9, 299-305 (1996)) y derivados de los mismos, tales como diacuerpos en tándem (Kipriyanov *et al.*, *J Mol Biol* 293, 41-66 (1999)). Un desarrollo más reciente son las moléculas denominadas DART (redirección de afinidad doble), que se basan en el formato de diacuerpos, pero presentan un puente disulfuro C terminal para estabilización adicional (Moore *et al.*, *Blood* 117, 4542-51 (2011)). También se han descrito proteínas de fusión Fab multiespecíficas (documento WO 2012/158818). Los denominados triomabs, que son moléculas de IgG completas híbridas de ratón/rata y que también se están evaluando actualmente en ensayos clínicos, representan un formato de tamaño más grande (revisado en Seimetz *et al.*, *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)).

50 La variedad de formatos que se están desarrollando muestra el gran potencial atribuido al redireccionamiento y activación de linfocitos T en inmunoterapia. Sin embargo, la tarea de generar anticuerpos biespecíficos adecuados para esto no es de ninguna manera trivial, sino que implica varios retos que se han de cumplir relacionados con eficacia, toxicidad, aplicabilidad y producibilidad de los anticuerpos.

55 Las construcciones pequeñas tales como, por ejemplo, las moléculas BiTE (aunque pueden reticular eficazmente células diana y efectoras) tienen una semivida en suero muy corta, lo que requiere que se administren a los pacientes por infusión continua. Una molécula BiTE ejemplar dirigida a CEA y CD3 se divulga en el documento WO 2007/071426. Por otra parte, los formatos de tipo IgG (aunque tienen el gran beneficio de una semivida larga) experimentan toxicidad asociada con las funciones efectoras naturales inherentes de las moléculas IgG. Su potencial inmunogénico constituye otro rasgo característico desfavorable de los anticuerpos biespecíficos de tipo IgG, especialmente los formatos no humanos, para un desarrollo terapéutico exitoso. Finalmente, un reto principal en el desarrollo general de anticuerpos biespecíficos ha sido la producción de construcciones de anticuerpos biespecíficos en una cantidad y pureza clínicamente suficientes, debido al emparejamiento incorrecto de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de especificidades diferentes tras la coexpresión, lo que disminuye el rendimiento de la construcción correctamente ensamblada y da como resultado varios productos secundarios no funcionales de los que el anticuerpo biespecífico deseado puede ser difícil separar.

Dadas las dificultades y desventajas asociadas con los anticuerpos biespecíficos actualmente disponibles para la inmunoterapia mediada por linfocitos T, sigue existiendo la necesidad de obtener formatos mejorados novedosos de dichas moléculas. La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas diseñadas para la activación y redireccionamiento de linfocitos T que combinan buena eficacia y producibilidad con baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas favorables.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3, que comprende la región determinante de la complementariedad 1 (CDR) de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10, en el que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se intercambian;

(ii) un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, cada uno de los cuales es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CEA, que comprende la CDR 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 28, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 29 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 30;

(iii) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en el que el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en el que el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un modo de realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprende cada uno una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

En un modo de realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno es cada uno una molécula Fab convencional.

En un modo de realización particular, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG. En un modo de realización específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En modos de realización particulares, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización específico de este tipo, un residuo aminoacídico del dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede colocar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y un residuo aminoacídico del dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que es posicionable la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

En un modo de realización específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza por un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza por un residuo de valina (Y407V); y opcionalmente (a) en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente el residuo de treonina en la posición

366 se reemplaza por un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza por un residuo de alanina (L368A); y/o (b) en la primera subunidad del dominio Fc, adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza por un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza por un residuo de cisteína (Y349C) (numeración EU de acuerdo con Kabat).

En un modo de realización particular, el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora. En un modo de realización, la una o más sustituciones aminoacídicas en el dominio Fc que reducen la unión a un receptor de Fc y/o la función efectora están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración EU). En modos de realización particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G. En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ. En un modo de realización, la función efectora es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste en el primer, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno, el dominio Fc y, opcionalmente, uno o más conectores peptídicos.

En un modo de realización específico, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 22, una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 56, una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 57, y una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 58.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido o pluralidad de polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención. La invención proporciona además una célula huésped que comprende el polinucleótido o pluralidad de polinucleótidos aislados de la invención.

En otro aspecto se proporciona un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se puede unir específicamente a CD3 y CEA, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y b) recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. La invención también engloba una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T producida por el procedimiento de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se engloban por la invención procedimientos de uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y la composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento. En un aspecto, se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En un modo de realización específico, la enfermedad es cáncer.

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. Configuraciones ejemplares de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas (TCB) activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento. (A) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab". (B) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab". (C) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab" con orden alternativo de los componentes Crossfab y Fab ("invertida"). (D) Ilustración de la molécula "1+1 CrossMab". (E) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab, cadena ligera unida". (F) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab, cadena ligera unida". (G) Ilustración de la molécula "2+1 IgG Crossfab, invertida, cadena ligera unida". (H) Ilustración de la molécula "1+1 IgG Crossfab, invertida, cadena ligera unida". Punto negro: modificación opcional en el dominio Fc que promueve la heterodimerización.

FIGURA 2. Alineación de clones anti-MCSP de afinidad madurada en comparación con el clon original no madurado (M4-3 ML2).

FIGURA 3. Dibujo esquemático de la molécula TCB MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida).

FIGURA 4. Análisis CE-SDS de la molécula TCB MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida, SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55). Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de TCB MCSP: A) no reducido, B) reducido.

FIGURA 5. Dibujo esquemático de la molécula TCB CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida).

FIGURA 6. Análisis CE-SDS de la molécula TCB CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida, SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58). Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de TCB CEA: A) no reducido, B) reducido.

FIGURA 7. Unión de TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55) a células A375 (MCSP⁺) (A) y células Jurkat (CD3⁺) (B). "TCB no dirigida": anticuerpo biespecífico que se acopla a CD3, pero no un segundo antígeno (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

FIGURA 8. Destrucción mediada por linfocitos T inducida por anticuerpo TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55) de células diana A375 (MCSP alto) (A), MV-3 (MCSP medio) (B), HCT-116 (MCSP bajo) (C) y LS180 (MCSP negativo) (D) (E:T = 10:1, PBMC humanos efectoras, tiempo de incubación 24 h). "TCB no dirigida": anticuerpo biespecífico que se acopla a CD3, pero no un segundo antígeno (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

FIGURA 9. Regulación por incremento de CD25 y CD69 en linfocitos T CD8⁺ (A, B) y CD4⁺ (C, D) humanos después de la destrucción mediada por linfocitos T de células de melanoma MV3 (E:T = 10:1, incubación 24 h) inducida por anticuerpo TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55). "TCB no dirigida": anticuerpo biespecífico que se acopla a CD3, pero no un segundo antígeno (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

FIGURA 10. Secreción de IL-2 (A), IFN- γ (B), TNF α (C), IL-4 (D), IL-10 (E) y granzima B (F) por PBMC humanos después de la destrucción mediada por linfocitos T de células de melanoma MV3 (E:T = 10:1, incubación 24 h) inducida por anticuerpo TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55). "TCB no dirigida": anticuerpo biespecífico que se acopla a CD3, pero no un segundo antígeno (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

FIGURA 11. Unión de TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58) a células de adenocarcinoma pulmonar A549 que expresan CEA (A) y líneas de linfocitos T humanos y de macaco cangrejero inmortalizadas que expresan CD3 (Jurkat (B) y HSC-F (C), respectivamente).

FIGURA 12. Destrucción mediada por linfocitos T inducida por TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58) de células HPAFII (CEA alto) (A, E), BxPC-3 (CEA medio) (B, F), ASPC-1 (CEA bajo) (C, G) y HCT-116 (CEA negativo) (D, H). E:T = 10:1, PBMC humanos efectoras, tiempo de incubación de 24 h (A-D) o 48 h (E-H). "TCB no dirigida": anticuerpo biespecífico que se acopla a CD3, pero no un segundo antígeno (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

FIGURA 13. Proliferación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ humanas (A-D) y regulación por incremento de CD25 en linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ humanos (E-H) 5 días después de la destrucción mediada por linfocitos T de células HPAFII (CEA alto) (A, E), BxPC-3 (CEA medio) (B, F), ASPC-1 (CEA bajo) (C, G) y HCT-116 (CEA negativo) (D, H) inducida por TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58). "TCB DP47": anticuerpo biespecífico que se acopla a CD3, pero no un segundo antígeno (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

FIGURA 14. Secreción de IFN- γ (A), TNF α (B), granzima B (C), IL-2 (D), IL-6 (E) e IL-10 (F) después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales MKN45 (E:T = 10:1, incubación 48 h) inducida por TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58). "TCB no dirigida": anticuerpo biespecífico que se acopla a CD3, pero no un segundo antígeno (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

FIGURA 15. Destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales LS180 que expresan CEA inducida por TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58) en presencia de concentraciones crecientes de CEA de desprendimiento (sCEA), detectada 24 h (A) o 48 h (B) después de la incubación con TCB CEA y sCEA.

FIGURA 16. Destrucción mediada por linfocitos T de células A549 (adenocarcinoma pulmonar) que sobreexpresan CEA humano (A549-hCEA), evaluada 21 h (A, B) y 40 h (C, D) después de la incubación con TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58) y PBMC humanos (A, C) o PBMC de macaco cangrejero (B, D) como células efectoras.

FIGURA 17. Destrucción mediada por linfocitos T de líneas celulares de cáncer colorrectal humano que expresan CEA inducida por TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58) a 0,8 nM (A), 4 nM (B) y 20 nM (C). (D) Correlación entre la expresión de CEA y el % de lisis específica a 20 nM de TCB CEA, (E) correlación entre la expresión de CEA y la CE₅₀ de TCB CEA.

FIGURA 18. Eficacia antitumoral *in vivo* de TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58) en un carcinoma de colon humano LS174T-fluc2 coinjertado con PBMC humanos (proporción E:T 5:1). Los resultados muestran el promedio y SEM de 12 ratones de volumen tumoral medido con un calibrador (A y C) y por bioluminiscencia (flujo total, B y D) en los diferentes grupos de estudio. (A, B) Tratamiento temprano a partir del día 1, (C, D) tratamiento retrasado a partir del día 7. La TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55) se usó como control negativo.

FIGURA 19. Eficacia antitumoral *in vivo* de TCB CEA (SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58) en un carcinoma de colon humano LS174T-fluc2 coinjertado con PBMC humanos (proporción E:T 1:1). Los resultados muestran el promedio

y SEM de 10 ratones de volumen tumoral medido con un calibrador (A) y por bioluminiscencia (flujo total, B) en los diferentes grupos de estudio. La TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55) se usó como control negativo.

5 FIGURA 20. Eficacia *in vivo* de TCB CEA murinizadas en un modelo de tumor ortotópico Panco2-huCEA en ratones transgénicos huCD3ε/huCEA inmunocompetentes.

FIGURA 21. Estabilidad térmica de TCB CEA. Dispersión dinámica de luz medida en una rampa de temperatura de 25-75 °C a 0,05 °C/min. El duplicado se muestra en gris.

10 FIGURA 22. Estabilidad térmica de TCB MCSP. Dispersión dinámica de luz medida en una rampa de temperatura de 25-75 °C a 0,05 °C/min. El duplicado se muestra como una línea gris.

15 FIGURA 23. Destrucción mediada por linfocitos T inducida por TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55) y anticuerpos TCB 1+1 CrossMab MCSP de células diana tumorales (A) A375 (MCSP alto), (B) MV-3 (MCSP medio) y (C) HCT-116 (MCSP bajo). (D) Se usó LS180 (línea celular tumoral negativa para MCSP) como control negativo. La destrucción de las células tumorales se evaluó 24 h (A-D) y 48 h (E-H) después de la incubación de las células diana con los anticuerpos y las células efectoras (PBMC humanos).

20 FIGURA 24. Regulación por incremento de CD25 y CD69 en linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan MCSP (A375 (A-D) y MV-3 (E-H)) mediada por TCB MCSP (SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55) y anticuerpos TCB 1+1 CrossMab MCSP.

25 FIGURA 25. Análisis CE-SDS de TCB DP47 GS (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida = "TCB no dirigida" (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62)) que contiene DP47 GS como anticuerpo de no unión y CH2527 humanizado como anticuerpo anti-CD3. Electroferograma mostrado como SDS-PAGE de TCB DP47 GS: A) no reducido, B) reducido.

Descripción detallada

Definiciones

30 Los términos se usan en el presente documento como se usan en general en la técnica, a menos que se defina de otro modo a continuación.

35 Como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión a antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión a antígeno son inmunoglobulinas y derivados, por ejemplo, fragmentos, de las mismas.

40 El término "biespecífica" quiere decir que la molécula de unión a antígeno se puede unir específicamente a al menos dos determinantes antigénicos distintos. Típicamente, una molécula de unión a antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica se puede unir simultáneamente a dos determinantes antigénicos, en particular dos determinantes antigénicos expresados en dos células distintas.

45 El término "valente" como se usa en el presente documento indica la presencia de un número especificado de sitios de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno. Como tal, el término "unión monovalente a un antígeno" indica la presencia de un (y no más de un) sitio de unión a antígeno específico para el antígeno en la molécula de unión a antígeno.

50 Un "sitio de unión a antígeno" se refiere al sitio, es decir, uno o más residuos aminoacídicos, de una molécula de unión a antígeno que proporciona interacción con el antígeno. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos aminoacídicos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Una molécula de inmunoglobulina natural típicamente tiene dos sitios de unión a antígeno, una molécula Fab típicamente tiene un único sitio de unión a antígeno.

55 Como se usa en el presente documento, el término "resto de unión a antígeno" se refiere a una molécula polipeptídica que se une específicamente a un determinante antigénico. En un modo de realización, un resto de unión a antígeno puede dirigir la entidad a la que se une (por ejemplo, un segundo resto de unión a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico. En otro modo de realización, un resto de unión a antígeno puede activar la señalización a través de su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del complejo receptor de linfocitos T. Los restos de unión a antígeno incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, como se define además en el presente documento. Los restos de unión a antígeno particulares incluyen un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una región variable de la cadena ligera del anticuerpo. En 60 determinados modos de realización, los restos de unión a antígeno pueden comprender regiones constantes de anticuerpo, como se define adicionalmente en el presente documento y es conocido en la técnica. Las regiones 65

constantes de la cadena pesada útiles incluyen cualquiera de los cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ o μ . Las regiones constantes de la cadena ligera útiles incluyen cualquiera de los dos isotipos: κ y λ .

5 Como se usa en el presente documento, el término "determinante antigénico" es sinónimo de "antígeno" y "epítipo" y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional constituida por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une un resto de unión a antígeno, formando un complejo de unión a antígeno-antígeno. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de células tumorales, en las superficies de células infectadas por virus, en las superficies de otras células afectadas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas denominadas antígenos en el presente documento (por ejemplo, MCSP, CEA, CD3) pueden ser cualquier forma natural de las proteínas de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. En un modo de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en el presente documento, el término engloba la proteína no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de ajuste o variantes alélicas. Las proteínas humanas ejemplares útiles como antígenos incluyen, pero no se limitan a: Proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), también conocido como proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4, UniProt n.º Q6UVK1 (versión 70), RefSeq NCBI n.º NP_001888.2); antígeno carcinoembrionario (CEA), también conocido como molécula 5 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM5, UniProt n.º P06731 (versión 119), RefSeq NCBI n.º NP_004354.2); y CD3, en particular la subunidad épsilon de CD3 (véase UniProt n.º P07766 (versión 130), NCBI RefSeq n.º NP_000724.1, SEQ ID NO: 103 para la secuencia humana; o UniProt n.º Q95LI5 (versión 49), NCBI GenBank n.º BAB71849.1, SEQ ID NO: 104 para la secuencia de macaco cangrejero [*Macaca fascicularis*]). En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento se une a un epítipo de CD3 o un antígeno de célula diana que se conserva entre el CD3 o el antígeno diana de diferentes especies. En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento se une a CD3 y CEACAM5, pero no se une a CEACAM1 o CEACAM6. Por "unión específica" se quiere decir que la unión es selectiva para el antígeno y se puede discriminar de las interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un resto de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En un modo de realización, el grado de unión de un resto de unión a antígeno a una proteína no relacionada es inferior a aproximadamente un 10 % de la unión del resto de unión a antígeno al antígeno medida, por ejemplo, mediante SPR. En determinados modos de realización, un resto de unión a antígeno que se une al antígeno, o una molécula de unión a antígeno que comprende ese resto de unión a antígeno, tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, un resto de unión a antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X por su compañera Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_D), que es la proporción de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{dis} y k_{as} , respectivamente). Por tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre que la proporción de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad se puede medir por procedimientos bien establecidos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Un procedimiento particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmón superficial (SPR).

"Unión reducida", por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, como se mide por ejemplo por SPR. Por claridad, el término incluye también la reducción de la afinidad hasta cero (o por debajo del límite de detección del procedimiento analítico), es decir, la supresión completa de la interacción. A la inversa, "unión incrementada" se refiere a un incremento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

60 "Activación de linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a una o más respuestas celulares de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionadas de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento pueden inducir la activación de linfocitos T. Los ensayos adecuados para medir la activación de linfocitos T son conocidos en la técnica descrita en el presente documento.

Un "antígeno de célula diana" como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor tal como una célula cancerosa o una célula del estroma tumoral.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "primero" y "segundo" con respecto a los restos de unión a antígeno, etc., se usan por conveniencia para distinguir cuando hay más de uno de cada tipo de resto. El uso de estos términos no pretende conferir un orden u orientación específicos de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a menos que explícitamente así se establezca.

10 Una "molécula Fab" se refiere a una proteína que consiste en el dominio VH y CH1 de la cadena pesada (la "cadena pesada de Fab") y el dominio VL y CL de la cadena ligera (la "cadena ligera de Fab") de una inmunoglobulina.

Por "fusionado" se quiere decir que los componentes (por ejemplo, una molécula Fab y una subunidad de dominio Fc) se unen por enlaces peptídicos, directamente o bien por medio de uno o más conectores peptídicos.

15 Como se usa en el presente documento, el término "monocatenaria" se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente por enlaces peptídicos. En determinados modos de realización, uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab monocatenaria, es decir, una molécula Fab en la que la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab están conectadas por un conector peptídico para formar una
20 única cadena peptídica. En dicho modo de realización particular, el extremo C de la cadena ligera de Fab se conecta al extremo N de la cadena pesada de Fab en la molécula Fab monocatenaria.

Por una molécula Fab "de entrecruzamiento" (también denominada "Crossfab") se quiere decir una molécula Fab en la que las regiones variables o las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de Fab se intercambian,
25 es decir, la molécula de Fab de entrecruzamiento comprende una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena ligera y la región constante de la cadena pesada, y una cadena peptídica compuesta por la región variable de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera. Por claridad, en una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena peptídica que comprende la región constante de la cadena pesada se denomina en el
30 presente documento "cadena pesada" de la molécula Fab de entrecruzamiento. A la inversa, en una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, la cadena peptídica que comprende la región variable de la cadena pesada se denomina en el presente documento "cadena pesada" de la molécula Fab de entrecruzamiento.

35 Al contrario que esto, por una molécula Fab "convencional" se quiere decir una molécula Fab en su formato natural, es decir, que comprende una cadena pesada compuesta por las regiones variable y constante de la cadena pesada (VH-CH1), y una cadena ligera compuesta por las regiones variable y constante de la cadena ligera (VL-CL). El término "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente
40 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio variable pesado o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamados regiones constantes de la cadena pesada. De forma similar, desde el extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable ligero o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio constante ligero (CL), también llamado región constante de la cadena
45 ligera. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, llamados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir además en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena ligera de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.
50 Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, unidos por medio de la región bisagra de inmunoglobulina.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos
55 de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para una
60 revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plückerthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para obtener un análisis de los fragmentos
65 Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen una semividua *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con

dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

El término "dominio de unión a antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpo (también llamados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden en general residuos aminoacídicos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos aminoacídicos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), y estos términos se usan en el presente documento de manera intercambiable en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión a antígeno. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) y Chothia *et al.*, J Mol Biol 196:901-917 (1987) han descrito esta región en particular, donde las definiciones incluyen residuos aminoacídicos superpuestos o subconjuntos de los mismos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Los residuos aminoacídicos apropiados que engloban las CDR, como se define en cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la tabla A como comparación. Los números de residuos exactos que engloba una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprende una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA A. Definiciones de CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
CDR1 V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 V _L	89-97	91-96	89-97

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla A está de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas por Kabat *et al.* (véase a continuación).

² "AbM" con una "b" minúscula como se usa en la tabla A se refiere a las CDR definidas por el programa informático de modelado de anticuerpos "AbM" de Oxford Molecular.

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias de región variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de región variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración

expuesto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique de otro modo, las referencias a la numeración de posiciones de residuos aminoacídicos específicas en una región variable de anticuerpo están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

5

Las secuencias polipeptídicas del listado de secuencias no se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, está dentro de la habilidad del experto en la técnica convertir la numeración de las secuencias del listado de secuencias a la numeración de Kabat.

10

"Región estructural" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

15

La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

20

El término "dominio Fc" o "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente para que se extienda de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxiterminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante está de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Una "subunidad" de un dominio Fc como se usa en el presente documento se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes C terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, que se pueden autoasociar de manera estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y un CH3 de IgG.

35

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Una modificación que promueve la asociación como se usa en el presente documento en particular incluye modificaciones separadas realizadas en cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en la que las modificaciones son complementarias entre sí para promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas de las subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por tanto, se produce (hetero)dimerización entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que podría ser no idéntico en el sentido de que otros componentes fusionados a cada una de las subunidades (por ejemplo, restos de unión a antígeno) no son los mismos. En algunos modos de realización, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación aminoacídica en el dominio Fc, específicamente una sustitución aminoacídica. En un modo de realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación aminoacídica separada, específicamente una sustitución aminoacídica, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

50

El término "funciones efectoras" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, captación de antígenos mediada por complejo inmunitario por células presentadoras de antígenos, regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

60

Como se usa en el presente documento, se considera que los términos "genomanipular, genomanipulado, genomanipulación" incluyen cualquier manipulación del esqueleto peptídico o las modificaciones postraduccionales de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La genomanipulación incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

65

El término "mutación aminoacídica", como se usa en el presente documento, pretende englobar sustituciones, deleciones, inserciones y modificaciones aminoacídicas. Cualquier combinación de sustitución, deleción, inserción y modificación se puede realizar para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a un receptor de Fc o asociación incrementada con otro péptido. Las deleciones e inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen deleciones e inserciones de aminoácidos amino y/o carboxiterminales. Las mutaciones aminoacídicas particulares son sustituciones aminoacídicas. Con el propósito de alterar, por ejemplo, las características de unión de una región Fc, son en particular preferentes las sustituciones aminoacídicas no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones aminoacídicas incluyen el reemplazo por aminoácidos no naturales o por derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Se pueden generar mutaciones aminoacídicas usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden incluir mutagénesis dirigida a sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles procedimientos de alteración del grupo de cadena lateral de un aminoácido por procedimientos distintos de genomanipulación, tales como modificación química. Se pueden usar diversas designaciones en el presente documento para indicar la misma mutación aminoacídica. Por ejemplo, se puede indicar una sustitución de prolina en la posición 329 del dominio Fc a glicina como 329G, G329, G₃₂₉, P329G o Pro329Gly.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o de manera intercambiable con, cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o producir por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo por síntesis química. Un polipéptido como se describe en el presente documento puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se denominan desplegados.

Por un polipéptido "aislado" o una variante o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede retirar de su entorno natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para los propósitos de la presente divulgación, ya que son polipéptidos naturales o recombinantes que se han separado, fraccionado o parcial o sustancialmente purificado mediante cualquier técnica adecuada.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Se configuran todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían. En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear

como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

5

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación de A y B del programa, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

10

15

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos peptidonucleicos (APN). El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquiera de uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

20

Por molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que se ha retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente divulgación. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterógenas o polinucleótidos (parcial o sustancialmente) purificados en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula polinucleotídica contenida en células que contienen normalmente la molécula polinucleotídica, pero la molécula polinucleotídica está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural. Las moléculas de ARN aislado incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro*, así como formas de hebra positiva y negativa, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente divulgación incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico pueden ser o pueden incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión a ribosoma o un finalizador de la transcripción.

25

30

35

Mediante un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica "idéntica" en al menos, por ejemplo, un 95 % a una secuencia nucleotídica de referencia, se pretende que la secuencia nucleotídica del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5 % de los nucleótidos de la secuencia de referencia se pueden delecionar o sustituir por otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5 % de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los residuos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Como una cuestión práctica, se puede determinar de forma convencional si cualquier secuencia polinucleotídica determinada es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos descrita en el presente documento, usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

40

45

50

El término "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor. En determinados modos de realización, el casete de expresión comprende secuencias polinucleotídicas que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas como se describe en el presente documento o fragmentos de las mismas.

55

60

El término "vector" o "vector de expresión" es sinónimo de "construcción de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que se asocia de forma funcional en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El vector de expresión descrito en el presente documento comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de ARNm estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula de ácido ribonucleico o proteína que se codifica por el gen se produce por el mecanismo de

65

transcripción y/o traducción celular. En un modo de realización, el vector de expresión descrito en el presente documento comprende un casete de expresión que comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas como se describe en el presente documento o fragmentos de las mismas.

5 Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombras algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

20 Un "receptor de Fc activador" es un receptor de Fc que, después del acoplamiento por un dominio Fc de un anticuerpo, provoca eventos de señalización que estimulan a la célula portadora del receptor para que realice funciones efectoras. Los receptores de Fc activadores humanos incluyen FcyRIIIa (CD16a), FcyRI (CD64), FcyRIIa (CD32) y FcaRI (CD89).

25 La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que da lugar a la lisis de células diana recubiertas de anticuerpo por células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente anticuerpos o derivados de los mismos que comprenden una región Fc, en general por medio de la parte proteica que es N terminal a la región Fc. Como se usa en el presente documento, el término "ADCC reducida" se define como una reducción en el número de células diana que se lisan en un tiempo dado, a una concentración de anticuerpo dada en el medio circundante a las células diana, por el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o bien un incremento en la concentración de anticuerpo en el medio circundante a las células diana, requerido para lograr la lisis de un número dado de células diana en un tiempo dado, por el mecanismo de ADCC. La reducción en la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar (que son conocidos para los expertos en la técnica), pero que no se ha genomanipulado. Por ejemplo, la reducción en ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución aminoacídica que reduce la ADCC es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución aminoacídica en el dominio Fc. Los ensayos adecuados para medir la ADCC son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, publicación PCT n.º WO 2006/082515 o publicación PCT n.º WO 2012/130831).

40 Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene efectos adversos de una enfermedad.

50 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

55 El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la formulación.

60 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

65 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se está tratando, y se puede realizar para profilaxis o bien durante la evolución de la medicina de laboratorio. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o

indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

Descripción detallada de los modos de realización

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3, y que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana.

En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de grupo de: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 31.

En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un modo de realización específico, el segundo resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CEA y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.

En otro modo de realización específico, el segundo resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CEA y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

En otro modo de realización específico, el segundo resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a MCSP y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.

En otro modo de realización específico, el segundo resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a MCSP y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20.

En otro modo de realización específico, el segundo resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a MCSP y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

- aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 51. En otro modo de realización específico, el segundo resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a MCSP y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.
- En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende
- (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3 que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;
- (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CEA que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.
- En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende
- (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,
- (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CEA que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.
- En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende
- (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3 que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;
- (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a MCSP que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20.
- En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende
- (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- (ii) un segundo resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a MCSP que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al

menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

5 En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variables o constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian.

En un modo de realización, el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional.

10 En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian, y el segundo resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En otro modo de realización particular, el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan entre sí, opcionalmente por medio de un conector peptídico.

15 En modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable. En otro modo de realización particular, no más de un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD3 está presente en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (es decir, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente a CD3).

Formatos de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T

25 Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden fusionar entre sí en una variedad de configuraciones. Las configuraciones ejemplares se representan en las figuras 1, 3 y 5. En modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable. En algunos modos de realización, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc.

30 En un modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno, y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

35 En otro modo de realización de este tipo, el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que el primer y el segundo resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc.

40 En otros modos de realización, el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc.

45 En un modo de realización particular de este tipo, el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer y un segundo resto de unión a antígeno, el dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o la segunda subunidad del dominio Fc. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí. Los restos de unión a antígeno se pueden fusionar al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un conector peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos. Los conectores peptídicos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, siendo "n", en general, un número entre 1 y 10,

típicamente entre 2 y 4. Un conector peptídico adecuado en particular para fusionar las cadenas ligeras de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno entre sí es (G₄S)₂. Un conector peptídico ejemplar adecuada para conectar las cadenas pesadas de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno es EPKSC(D)-(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 105 y 106). Adicionalmente, los conectores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. En particular, cuando un resto de unión a antígeno se fusiona al extremo N de una subunidad del dominio Fc, se puede fusionar por medio de una región bisagra de inmunoglobulina o una porción de la misma, con o sin un conector peptídico adicional.

Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con un único resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana (por ejemplo, como se muestra en la figura 1A, 1D, 1F o 1H) es útil, en particular en casos donde se espera internalización del antígeno de célula diana después de la unión de un resto de unión a antígeno de alta afinidad. En dichos casos, la presencia de más de un resto de unión a antígeno específico para el antígeno de célula diana puede potenciar la internalización del antígeno de célula diana, reduciendo de este modo su disponibilidad.

En muchos otros casos, sin embargo, será ventajoso tener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dos o más restos de unión a antígeno específicos para un antígeno de célula diana (véanse los ejemplos mostrados en la figura 1B, 1C, 1E o 1G), por ejemplo, para optimizar la dirección al sitio diana o para permitir la reticulación de antígenos de células diana.

En consecuencia, en determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento comprende además un tercer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana. En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional. En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente al mismo antígeno de célula diana que el segundo resto de unión a antígeno. En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana. En un modo de realización particular, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno son idénticos (es decir, comprenden las mismas secuencias de aminoácidos).

En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a CEA, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.

En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a CEA, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.

En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a CEA, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.

En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de grupo de: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 31, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a CEA, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende

una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

5 En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a CEA, en el
10 que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

15 En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a MCSP, en el que el segundo y tercer resto de unión a antígeno comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.

25 En un modo de realización particular, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a MCSP, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.

35 En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a MCSP, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20.

45 En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de grupo de: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 31, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a MCSP, en el que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena ligera que comprende una
50 secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 51.

60 En un modo de realización, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a CD3, y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden unir específicamente a MCSP, en el que el
65 segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %

idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

5 En un modo de realización, el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera o segunda subunidad del dominio Fc. En un modo de realización más específico, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

15 El segundo y el tercer resto de unión a antígeno se pueden fusionar al dominio Fc directamente o a través de un conector peptídico. En un modo de realización particular, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina. En un modo de realización específico, la región bisagra de inmunoglobulina es una región bisagra de IgG₁ humana. En un modo de realización, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno y el dominio Fc forman parte de una molécula de inmunoglobulina. En un modo de realización particular, la molécula de inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la clase IgG. En un modo de realización incluso más particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₁. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de subclase IgG₄. En otro modo de realización particular, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En otros modos de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica o una inmunoglobulina humanizada. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en una molécula de inmunoglobulina que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana, y un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD3 en el que el resto de unión a antígeno es una molécula Fab, en particular una molécula Fab de entrecruzamiento, fusionada al extremo N de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, opcionalmente a través de un conector peptídico.

30 En un modo de realización particular, el primer y el tercer resto de unión a antígeno se fusionan cada uno en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de una de las subunidades del dominio Fc, y el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno. En un modo de realización específico de este tipo, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste esencialmente en un primer, un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos, en la que el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc. Opcionalmente, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se pueden fusionar adicionalmente entre sí.

45 En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3, que comprende la región determinante de la complementariedad 1 (CDR) de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10, en el que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variables o constantes, en particular las regiones constantes, de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se intercambian;

(ii) un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, cada uno de los cuales es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CEA, que comprende la CDR 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 28, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 29 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 30.

60 En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al

menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, en el que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variables o constantes, en particular las regiones constantes, de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian;

5

(ii) un segundo y un tercer resto de unión a antígeno que cada uno es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CEA que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

10

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

15

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3, que comprende la región determinante de la complementariedad 1 (CDR) de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10, en el que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variables o constantes, en particular las regiones constantes, de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se intercambian;

20

(ii) un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, cada uno de los cuales es una molécula Fab que se puede unir específicamente a MCSP, que comprende la CDR 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 14, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 18, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 19 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20.

25

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende

30

(i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, en el que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones variables o constantes, en particular las regiones constantes, de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian;

35

40

(ii) un segundo y un tercer resto de unión a antígeno que cada uno es una molécula Fab que se puede unir específicamente a MCSP que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

45

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con cualquiera de los cuatro modos de realización anteriores puede comprender además (iii) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable, en la que el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en la que el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab al extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

50

55

En algunas de las moléculas de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descritas en el presente documento, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno y la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se fusionan entre sí, opcionalmente por medio de un conector peptídico. Dependiendo de la configuración del primer y el segundo resto de unión a antígeno, la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno se puede fusionar en su extremo C al extremo N de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno, o la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno se puede fusionar en su extremo C al extremo N de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno. La fusión de las cadenas ligeras de Fab del primer y el segundo resto de unión a antígeno reduce además el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesada y ligera de Fab no coincidentes, y también reduce el número de plásmidos necesarios para la

60

65

expresión de algunas de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento.

5 En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno (es decir, el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VL₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)), y un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)). En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno (VH₍₁₎-CL₍₁₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

20 En modos de realización alternativos, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno (es decir, el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CL₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)), y un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)). En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno (VL₍₁₎-CH1₍₁₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

35 En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno (es decir, el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)). En otros modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno (es decir, el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno, que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)). Todavía en otros modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno (es decir, el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región variable de la cadena pesada se reemplaza por una región variable de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). En otros modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab del segundo resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno (es decir, el primer resto de unión a antígeno comprende una cadena pesada de Fab de entrecruzamiento, en la que la región constante de la cadena pesada se reemplaza por una región constante de la cadena ligera), que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)).

65 En algunos de estos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido de la cadena ligera de Fab de entrecruzamiento del primer resto de unión a

antígeno, en el que la región variable de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno (VH₍₁₎-CL₍₁₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno (VL₍₂₎-CL₍₂₎). En otros de estos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido de la cadena ligera de Fab de entrecruzamiento en el que la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno (VL₍₁₎-CH1₍₁₎) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno (VL₍₂₎-CL₍₂₎). Todavía en otros de estos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende además un polipéptido en el que la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno (VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CL₍₂₎), un polipéptido en el que la región variable de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno (VH₍₁₎-CL₍₁₎-VL₍₂₎-CL₍₂₎), un polipéptido en el que el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno (VL₍₂₎-CL₍₂₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎), o un polipéptido en el que el polipéptido de la cadena ligera de Fab del segundo resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región variable de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno que a su vez comparte un enlace peptídico carboxiterminal con la región constante de la cadena ligera de Fab del primer resto de unión a antígeno (VL₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎).

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de acuerdo con estos modos de realización puede comprender además (i) un polipéptido de subunidad del dominio Fc (CH2-CH3(-CH4)), o (ii) un polipéptido en el que la cadena pesada de Fab de un tercer resto de unión a antígeno comparte un enlace peptídico carboxiterminal con una subunidad del dominio Fc (VH₍₃₎-CH1₍₃₎-CH2-CH3(-CH4)) y el polipéptido de la cadena ligera de Fab de un tercer resto de unión a antígeno (VL₍₃₎-CL₍₃₎). En determinados modos de realización, los polipéptidos se unen covalentemente, por ejemplo, por un enlace disulfuro.

De acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores, los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (por ejemplo, resto de unión a antígeno, dominio Fc) se pueden fusionar directamente o a través de diversos conectores, en particular conectores peptídicos que comprenden uno o más aminoácidos, típicamente aproximadamente 2-20 aminoácidos, que se describen en el presente documento o son conocidos en la técnica. Los conectores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los conectores peptídicos (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n o G₄(SG₄)_n, en los que "n" es, en general, un número entre 1 y 10, típicamente entre 2 y 4.

Dominio Fc

El dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T consiste en un par de cadenas polipeptídicas que comprenden dominios de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, del que cada unidad comprende los dominios constantes de la cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc se pueden asociar de manera estable entre sí. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento comprende no más de un dominio Fc.

En un modo de realización descrito en el presente documento, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T es un dominio Fc de IgG. En un modo de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otro modo de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En un modo de realización más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende una sustitución aminoacídica en la posición S228 (numeración EU), en particular la sustitución aminoacídica S228P. Esta sustitución aminoacídica reduce el intercambio *in vivo* en el brazo Fab de los anticuerpos IgG₄ (véase Stubenrauch *et al.*, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En otro modo de realización particular, el dominio Fc es humano. Una secuencia ejemplar de una región Fc de IgG₁ humana se da en SEQ ID NO: 107.

Modificaciones en el dominio Fc que promueven la heterodimerización

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento comprenden diferentes restos de unión a antígeno, fusionados a una u otra de las dos subunidades del dominio Fc; por tanto, las dos subunidades del dominio Fc están típicamente comprendidas en dos cadenas polipeptídicas no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización dan lugar a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T en producción recombinante, será ventajoso, por tanto,

introducir en el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

5 En consecuencia, en modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más extensa entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por tanto, en un modo de realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

10 En un modo de realización específico, dicha modificación es una modificación llamada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

15 La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). En general, el procedimiento implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen reemplazando cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensadoras de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

25 En consecuencia, en un modo de realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que es posicionable en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que es posicionable la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

30 La protuberancia y la cavidad se pueden realizar alterando el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, por mutagénesis específica de sitio o por síntesis peptídica.

35 En un modo de realización específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza el residuo de treonina en la posición 366 por un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza el residuo de tirosina en la posición 407 por un residuo de valina (Y407V). En un modo de realización, en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente se reemplaza el residuo de treonina en la posición 366 por un residuo de serina (T366S) y se reemplaza el residuo de leucina en la posición 368 por un residuo de alanina (L368A).

40 Aún en otro modo de realización, en la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 por un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 por un residuo de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, estabilizando adicionalmente el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

45 En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3 se fusiona (opcionalmente a través del resto de unión a antígeno que se puede unir a un antígeno de célula diana) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación "botón"). Sin quedar vinculado a ninguna teoría, la fusión del resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3 a la subunidad que contiene un botón del dominio Fc minimizará (además) la generación de moléculas de unión a antígeno que comprenden dos restos de unión a antígeno que se pueden unir a CD3 (impedimento estérico de dos polipéptidos que contienen botón).

50 En un modo de realización alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media en los efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. En general, este procedimiento implica el reemplazo de uno o más residuos aminoacídicos en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc por residuos aminoacídicos cargados de modo que la formación de homodímeros se vuelve electrostáticamente desfavorable pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable.

Modificaciones en el dominio Fc que reducen la unión al receptor de Fc y/o la función efectora

65 El dominio Fc confiere a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T propiedades farmacocinéticas favorables, incluyendo una semivida en suero larga que contribuye a una buena acumulación en

el tejido diana y una proporción de distribución tejido-sangre favorable. Al mismo tiempo, sin embargo, puede dar lugar a la dirección indeseable de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T hacia células que expresan receptores de Fc en lugar de a las células portadoras de antígenos preferentes. Además, la coactivación de las rutas de señalización del receptor de Fc puede dar lugar a la liberación de citocinas lo que, en combinación con las propiedades activadoras de linfocitos T y la semivida larga de la molécula de unión a antígeno, da como resultado una activación excesiva de receptores de citocinas y efectos secundarios graves tras la administración sistémica. La activación de células inmunitarias (portadoras del receptor de Fc) distintas de linfocitos T incluso puede reducir la eficacia de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T debido a la destrucción potencial de linfocitos T, por ejemplo, por linfocitos NK.

En consecuencia, en modos de realización particulares, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento presenta una afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con el dominio Fc de IgG₁ natural. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural), y/o menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 % y lo más preferentemente menos de un 5 % de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural). En un modo de realización, el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor de Fc y/o induce función efectora. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En un modo de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano activador, más específicamente Fc γ R1IIa, Fc γ RI o Fc γ R1IIa humano, lo más específicamente Fc γ R1IIa humano. En un modo de realización, la función efectora es una o más seleccionada del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En un modo de realización particular, la función efectora es ADCC. En un modo de realización, el dominio Fc presenta una afinidad de unión sustancialmente similar al receptor de Fc neonatal (FcRn) en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural. Se logra una unión sustancialmente similar a FcRn cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 %, en particular más de aproximadamente un 80 %, más en particular más de aproximadamente un 90 % de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG₁ natural (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc de IgG₁ natural) por FcRn.

En determinados modos de realización, el dominio Fc se genomanipula para tener afinidad de unión reducida por un receptor de Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. En modos de realización particulares, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una o más mutaciones aminoacídicas que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o función efectora. Típicamente, la misma o más mutaciones aminoacídicas están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En un modo de realización, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc. En un modo de realización, la mutación aminoacídica reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc en al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En modos de realización donde existe más de una mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por el receptor de Fc, la combinación de estas mutaciones aminoacídicas puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc en al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc genomanipulado presenta menos de un 20 %, en particular menos de un 10 %, más en particular menos de un 5 % de la afinidad de unión por un receptor de Fc en comparación con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado. En un modo de realización particular, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ . En algunos modos de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc humano. En algunos modos de realización, el receptor de Fc es un receptor de Fc activador. En un modo de realización específico, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ humano activador, más específicamente Fc γ R1IIa, Fc γ RI o Fc γ R1IIa humano, lo más específicamente Fc γ R1IIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunos modos de realización también se reduce la afinidad de unión por un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión por C1q. En un modo de realización, no se reduce la afinidad de unión por el receptor de Fc neonatal (FcRn). La unión sustancialmente similar a FcRn, es decir, la conservación de la afinidad de unión del dominio Fc por dicho receptor, se logra cuando el dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicho dominio Fc) presenta más de aproximadamente un 70 % de la afinidad de unión de una forma no genomanipulada del dominio Fc (o la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende dicha forma no genomanipulada del dominio Fc) por FcRn. El dominio Fc, o las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento que comprenden dicho dominio Fc, pueden presentar más de aproximadamente un 80 % e incluso más de aproximadamente un 90 % de dicha afinidad. En determinados modos de realización, el dominio Fc de la molécula de unión a antígeno

- biespecífica activadora de linfocitos T se genomanipula para tener función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no genomanipulado. La función efectora reducida puede incluir, pero no se limita a, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, captación de antígenos mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígenos reducida, unión a linfocitos NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce apoptosis reducida, reticulación de anticuerpos unidos a diana reducida, maduración de células dendríticas reducida o activación de linfocitos T reducida. En un modo de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción de citocinas reducida. En un modo de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En un modo de realización, la ADCC reducida es menor de un 20 % de la ADCC inducida por un dominio Fc no genomanipulado (o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc no genomanipulado).
- En un modo de realización, la mutación aminoacídica que reduce la afinidad de unión del dominio Fc por un receptor de Fc y/o función efectora es una sustitución aminoacídica. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329. En un modo de realización más específico, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329. En algunos modos de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A y L235A. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329. En un modo de realización más específico, la sustitución aminoacídica es P329A o P329G, en particular, P329G. En un modo de realización, el dominio Fc comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329 y una sustitución aminoacídica adicional en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331. En un modo de realización más específico, la otra sustitución aminoacídica es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En modos de realización particulares, el dominio Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones P329, L234 y L235. En más modos de realización particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G ("P329G LALA"). En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, en particular un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación "P329G LALA" de sustituciones aminoacídicas anula casi por completo la unión al receptor de Fcγ (así como al complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humana, como se describe en la publicación PCT n.º WO 2012/130831. El documento WO 2012/130831 también describe procedimientos de preparación de dichos dominios Fc mutantes y procedimientos para determinar sus propiedades tales como unión al receptor de Fc o funciones efectoras.
- Los anticuerpos IgG₄ presentan una afinidad de unión reducida por receptores de Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con anticuerpos IgG₁. Por tanto, en algunos modos de realización, el dominio Fc de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento es un dominio Fc de IgG₄, en particular un dominio Fc de IgG₄ humana. En un modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en la posición S228, específicamente la sustitución aminoacídica S228P. Para reducir además su afinidad de unión por un receptor de Fc y/o su función efectora, en un modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición L235, específicamente la sustitución aminoacídica L235E. En otro modo de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución aminoacídica en la posición P329, específicamente la sustitución aminoacídica P329G. En un modo de realización particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones aminoacídicas S228P, L235E y P329G. Dichos mutantes de dominio Fc de IgG₄ y sus propiedades de unión al receptor de Fcγ se describen en la publicación PCT n.º WO 2012/130831.
- En un modo de realización particular, el dominio Fc que presenta afinidad de unión por un receptor de Fc reducida y/o una función efectora reducida en comparación con un dominio Fc de IgG₁ natural es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG₄ humana que comprende las sustituciones aminoacídicas S228P, L235E y opcionalmente P329G.
- En determinados modos de realización se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En un modo de realización de este tipo, el dominio Fc comprende una mutación aminoacídica en la posición N297, en particular, una sustitución aminoacídica que reemplaza asparagina por alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D).
- Además de los dominios Fc descritos anteriormente en el presente documento y en la publicación PCT n.º WO 2012/130831, los dominios Fc con unión a receptor de Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 del dominio Fc (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).
- Se pueden preparar dominios Fc mutantes por delección, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos usando procedimientos genéticos o químicos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos genéticos pueden

incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica, y similares. Los cambios nucleotídicos correctos se pueden verificar, por ejemplo, por secuenciación.

La unión a receptores de Fc se puede determinar fácilmente, por ejemplo, por ELISA, o por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores de Fc tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. Un ensayo de unión de este tipo adecuado se describe en el presente documento. De forma alternativa, se puede evaluar la afinidad de unión de dominios Fc o moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos que comprenden un dominio Fc por los receptores de Fc usando líneas celulares conocidas por expresar receptores de Fc particulares, tales como linfocitos NK humanos que expresan el receptor de FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende un dominio Fc, se puede medir por procedimientos conocidos en la técnica. Un ensayo adecuado para medir la ADCC se describe en el presente documento. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362; Hellstrom *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente de EE. UU. n.º 5.821.337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunos modos de realización, se reduce la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunos modos de realización en los que se genomanipula el dominio Fc para que tenga una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede unir a C1q y, por tanto, tener actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Restos de unión a antígeno

La molécula de unión a antígeno descrita en el presente documento es biespecífica, es decir, comprende al menos dos restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a dos determinantes antigénicos distintos. Como se describe en el presente documento, los restos de unión a antígeno son moléculas Fab (es decir, dominios de unión a antígeno compuestos de una cadena pesada y una ligera, comprendiendo cada una un dominio variable y uno constante). En un modo de realización, dichas moléculas Fab son humanas. En otro modo de realización, dichas moléculas Fab son humanizadas. En otro modo de realización más, dichas moléculas Fab comprenden regiones constantes de la cadena pesada y ligera humanas.

Al menos uno de los restos de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento. Dicha modificación evita el emparejamiento incorrecto de las cadenas pesada y ligera a partir de diferentes moléculas Fab, mejorando de este modo el rendimiento y la pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento en la producción recombinante. En una molécula Fab de entrecruzamiento particular útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento, las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian. En otra molécula Fab de entrecruzamiento útil para la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento, las regiones variables de la cadena ligera de Fab y la cadena pesada de Fab se intercambian.

En un modo de realización particular descrito en el presente documento, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede unir simultáneamente a un antígeno de célula diana, en particular un antígeno de célula tumoral, y a CD3. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede entrecruzar un linfocito T y una célula diana mediante unión simultánea a un antígeno de célula diana y a CD3. En un modo de realización incluso más particular, dicha unión simultánea da como resultado la lisis de la célula diana, en particular una célula tumoral. En un modo de realización, dicha unión simultánea da como resultado la activación del linfocito T. En otros modos de realización, dicha unión simultánea da como resultado una respuesta celular de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico, seleccionada del grupo de: proliferación, diferenciación, secreción de citocinas, liberación de moléculas efectoras citotóxicas, actividad citotóxica y expresión de marcadores de activación. En un modo de realización, la unión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a CD3 sin unión simultánea al antígeno de la célula diana no da como resultado la activación del linfocito T.

En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede redireccionar la actividad citotóxica de un linfocito T hacia una célula diana. En un modo de realización particular, dicho redireccionamiento es independiente de la presentación de antígenos peptídicos mediada por MHC por la célula diana y/o la especificidad del linfocito T.

En particular, un linfocito T de acuerdo con cualquiera de los modos de realización descritos en el presente documento es un linfocito T citotóxico. En algunos modos de realización, el linfocito T es un linfocito T CD4⁺ o CD8⁺, en particular un linfocito T CD8⁺.

Resto de unión a CD3

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir a CD3 (también denominado en el presente documento "resto de unión a antígeno CD3" o "primer resto de unión a antígeno"). En un modo de realización particular, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD3. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T proporciona unión monovalente a CD3. El resto de unión a antígeno CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento, es decir, una molécula Fab en la que se intercambian las regiones variables o constantes de las cadenas pesada y ligera de Fab. En modos de realización donde hay más de un resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana comprendido en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, el resto de unión a antígeno que se puede unir específicamente a CD3 es preferentemente una molécula Fab de entrecruzamiento y los restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana son moléculas Fab convencionales.

En un modo de realización particular, el CD3 es CD3 humano (SEQ ID NO: 103) o CD3 de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 104), lo más en particular CD3 humano. En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno CD3 es reactiva de forma cruzada para (es decir, se une específicamente a) CD3 humano y de macaco cangrejero. En algunos modos de realización, el primer resto de unión a antígeno se puede unir específicamente a la subunidad épsilon de CD3.

El resto de unión a antígeno CD3 comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno CD3 comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno CD3 comprende una secuencia de región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y una secuencia de región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 31.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno CD3 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 31.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno CD3 comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 3 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 7.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno CD3 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un modo de realización, el resto de unión a antígeno CD3 comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7.

Resto de unión al antígeno de célula diana

- La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento comprende al menos un resto de unión a antígeno que se puede unir a un antígeno de célula diana (también denominado en el presente documento "resto de unión a antígeno de célula diana" o "segundo" o "tercer" resto de unión a antígeno). En determinados modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende dos restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana. En un modo de realización particular de este tipo, cada uno de estos restos de unión a antígeno se une específicamente al mismo determinante antigénico. En un modo de realización aún más particular, todos estos restos de unión a antígeno son idénticos. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una molécula de inmunoglobulina que se puede unir específicamente a un antígeno de célula diana. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende no más de dos restos de unión a antígeno que se pueden unir específicamente a un antígeno de célula diana.
- El resto de unión a antígeno de célula diana es en general una molécula Fab, en particular una molécula Fab convencional que se une a un determinante antigénico específico y puede dirigir la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral que porta el determinante antigénico.
- En determinados modos de realización, el resto de unión a antígeno de célula diana se une específicamente a un antígeno de superficie celular. En un modo de realización particular, el resto de unión a antígeno de célula diana se une específicamente a una región proximal a la membrana de un antígeno de superficie celular. En un modo de realización específico de este tipo, el antígeno de superficie celular es el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la región proximal a la membrana es el dominio B3 de CEA (residuos 208-286 de SEQ ID NO: 119). En otro modo de realización específico de este tipo, el antígeno de superficie celular es el proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP) y la región proximal a la membrana es el dominio D3 de MCSP (SEQ ID NO: 118).
- En determinados modos de realización, el resto de unión a antígeno de célula diana se dirige a un antígeno asociado con una afección patológica, tal como un antígeno presentado en una célula tumoral o una célula infectada por virus. Los antígenos adecuados son antígenos de superficie celular, por ejemplo, pero sin limitarse a, receptores de superficie celular. En modos de realización particulares, el antígeno es un antígeno humano. En un modo de realización específico, el antígeno de célula diana se selecciona de proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP, CSPG4) y antígeno carcinoembrionario (CEA, CEACAM5).
- En algunos modos de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende al menos un resto de unión a antígeno que es específico para el proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP). En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.
- En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20.
- En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 14, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 18, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 19 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20.
- En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 51.
- En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 41 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 51.

- 5 En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 13 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 17, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.
- 10 En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.
- 15 En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para MCSP comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17.
- 20 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 12, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 53, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 54, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 55.
- 25 En modos de realización particulares, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende al menos un resto de unión a antígeno que es específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA). En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 y al menos una CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.
- 30 En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende la CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24, la CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25, la CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26, la CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 28, la CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 29 y la CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 30.
- 35 En otro modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 23 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 27, o variantes de las mismas que conservan la funcionalidad.
- 40 En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.
- 45 En un modo de realización, el resto de unión a antígeno que es específico para CEA comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 23 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 27.
- 50 En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T comprende una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 22, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 56, una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 57, y una secuencia polipeptídica que es al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 58.
- 55 **Polinucleótidos**
- 60 La divulgación proporciona además polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma. En algunos modos de realización, dicho fragmento es un fragmento de unión a antígeno.
- 65 Los polinucleótidos como se describen en el presente documento incluyen aquellos que son al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos a las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 y 98, incluyendo fragmentos funcionales o variantes de los mismos.

Los polinucleótidos que codifican moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describen en el presente documento se pueden expresar como un único polinucleótido que codifica toda la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan se pueden asociar a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena ligera de un resto de unión a antígeno se puede codificar por un polinucleótido separado de la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende la porción de la cadena pesada del resto de unión a antígeno, una subunidad del dominio Fc y opcionalmente (parte de) otro resto de unión a antígeno. Cuando se coexpresen, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena ligera para formar el resto de unión a antígeno. En otro ejemplo, la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) uno o más restos de unión a antígeno se podría codificar por un polinucleótido separado de la porción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende la otra de las dos subunidades del dominio Fc y opcionalmente (parte de) un resto de unión a antígeno. Cuando se coexpresen, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunos modos de realización, el polinucleótido aislado codifica toda la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento. En otros modos de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento.

En otro modo de realización, la presente divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de la región variable como se muestra en SEQ ID NO: 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 o 51. En otro modo de realización, la presente divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica como se muestra en las SEC ID NO: 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 y 55. En otro modo de realización, la divulgación se dirige además a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98. En otro modo de realización, la divulgación se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98. En otro modo de realización, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia de la región variable que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 o 51. En otro modo de realización, la divulgación se dirige a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o un fragmento de la misma, en el que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica una secuencia polipeptídica que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 o 55. La divulgación engloba un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia de región variable de SEQ ID NO: 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 o 51 con sustituciones aminoácidas conservadoras. La divulgación también engloba un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la misma, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 o 55 con sustituciones aminoácidas conservadoras.

En determinados modos de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros modos de realización, un polinucleótido como se describe en el presente documento es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN como se describe en el presente documento puede ser monocatenario o bicatenario.

Procedimientos recombinantes

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describe en el presente documento se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis peptídica en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que

codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento), por ejemplo, como se describe anteriormente, se aíslan o insertan en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales. En un modo de realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos como se describe en el presente documento. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento) junto con señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que el polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento) (es decir, la región codificante) se clona en asociación funcional con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente; sin embargo, cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no es parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones polinucleotídicas separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector como se describe en el presente documento puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan de forma postraduccionales o cotraduccionales en las proteínas finales a través de escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico como se describe en el presente documento puede codificar regiones codificantes heterógenas, fusionadas o bien no fusionadas a un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento) descrita en el presente documento, o variante o derivado de la misma. Las regiones codificantes heterógenas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterógeno. Una asociación funcional es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal forma que sitúa la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) se "asocian de forma funcional" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión de dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Por tanto, una región promotora se asociaría de forma funcional con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor puede efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, se pueden asociar de forma funcional con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. En el presente documento se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Es conocida una variedad de regiones de control de la transcripción por los expertos en la técnica. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero sin limitarse a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, conjuntamente con intrón-A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovina y α -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos tisulares, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles de tetraciclinas). De forma similar, es conocida una variedad de elementos de control de la traducción por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y terminación de la traducción y elementos derivados de sistemas víricos (en particular un sitio de entrada al ribosoma interno o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otros rasgos característicos tales como un origen de replicación y/o elementos de integración cromosómica tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas o repeticiones terminales invertidas (ITR) víricas adenoasociadas (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos como se describe en el presente documento se pueden asociar a regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señalizadores, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido descrito en el presente documento. Por ejemplo, si se desea la secreción de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, se puede disponer el ADN que codifica una secuencia señal en dirección 5' del ácido nucleico que codifica una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento o un fragmento de la

misma. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrado en general tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinados modos de realización se usa el péptido señal natural, por ejemplo, un péptido señal de la cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está funcionalmente asociado con él. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterógeno o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural se puede sustituir por la secuencia líder del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón. Las secuencias de aminoácidos y polinucleótidos ejemplares de los péptidos señal secretores se muestran en SEQ ID NO: 108-116.

El ADN que codifica una secuencia proteica corta que se podría usar para facilitar la posterior purificación (por ejemplo, una marca de histidina) o ayudar a marcar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede incluir dentro de o en los extremos del polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T (fragmento).

En otro modo de realización se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos como se describe en el presente documento. En determinados modos de realización se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores como se describe en el presente documento. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, descritos en el presente documento en relación con polinucleótidos y vectores, respectivamente. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que se puede genomanipular para generar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento o fragmentos de las mismas. Las células huésped adecuadas para replicación y para sustentar la expresión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o transducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariontes, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos en bacterias, en particular cuando no se necesita glucosilación. Después de la expresión, se puede aislar el polipéptido a partir de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de procariontes, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con rutas de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar junto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas de células de mamífero que se adaptan a su cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293T como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J Gen Virol* 36, 59 (1977)), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (linfocitos TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562), linfocitos TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO-DHFR (Urlaub *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de proteínas, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas en un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En un modo de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal

como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, célula YO, NS0, Sp20).

Las tecnologías estándar son conocidas en la técnica por expresar genes exógenos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o bien la ligera de un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo se pueden genomanipular para expresar también la otra de las cadenas de anticuerpo de modo que el producto expresado es un anticuerpo que tiene tanto una cadena pesada como una ligera.

En un modo de realización se proporciona un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, como se proporciona en el presente documento, en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, y recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la célula huésped (o medio de cultivo de célula huésped).

Los componentes de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se fusionan genéticamente entre sí. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se puede diseñar de modo que sus componentes se fusionen directamente entre sí o indirectamente a través de una secuencia conectora. La composición y longitud del conector se pueden determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica y se puede someter a prueba para determinar su eficacia. Los ejemplos de secuencias conectoras entre diferentes componentes de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se encuentran en las secuencias proporcionadas en el presente documento. También se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión si se desea, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasas.

En determinados modos de realización, el uno o más restos de unión a antígeno de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T comprenden al menos una región variable de anticuerpo que se puede unir a un determinante antigénico. Las regiones variables pueden formar parte de y derivar de anticuerpos naturales o no naturales y fragmentos de los mismos. Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.186.567) o se pueden obtener, por ejemplo, cribando colecciones combinatorias que comprendan cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.969.108 concedida a McCafferty).

Se puede usar cualquier especie de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o región variable animal en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, dominios de unión a antígeno o regiones variables no limitantes útiles de acuerdo con la presente divulgación pueden ser de origen murino, primate o humano. Si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T está destinada al uso humano, se puede usar una forma química de anticuerpo en la que las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o totalmente humana del anticuerpo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.565.332 concedida a Winter). La humanización se puede lograr mediante diversos procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones estructurales y constantes humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de residuos de la región estructural críticos (por ejemplo, los que son importantes para retener buenas funciones de afinidad de unión a antígeno o de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de la especificidad (SDR o a-CDR; los residuos críticos para la interacción anticuerpo-antígeno) no humanas en regiones estructurales y constantes humanas, o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos completos, pero "enmascararlos" con una sección similar a humana mediante el reemplazo de residuos superficiales. Los anticuerpos humanizados y procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Jones *et al.*, *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immunol* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, *Methods* 36, 25-34 (2005) (que describen un injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36, 43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" al reordenamiento de FR). Se pueden producir anticuerpos humanos y regiones variables humanas usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte de y derivar de anticuerpos monoclonales humanos preparados por el procedimiento de hibridoma (véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibody Production Techniques*

and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). También se pueden preparar anticuerpos humanos y regiones variables humanas administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica (véase, por ejemplo, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). También se pueden generar anticuerpos humanos y regiones variables humanas aislando secuencias de regiones variables de clones de Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, *Nature* 348, 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352, 624-628 (1991)). Los fagos presentan típicamente fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab.

En determinados modos de realización, los restos de unión a antígeno útiles de acuerdo con la presente divulgación se genomanipulan para tener una afinidad de unión potenciada de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos divulgados en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132066. La capacidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento para unirse a un determinante antigénico específico se puede medir a través de un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o bien otras técnicas familiares para un experto en la técnica, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un sistema BIACORE T100) (Liljeblad, *et al.*, *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Se pueden usar ensayos de competición para identificar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de unión a antígeno o dominio variable que compite con un anticuerpo de referencia por unirse a un antígeno particular, por ejemplo, un anticuerpo que compite con el anticuerpo V9 por unirse a CD3. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que se une mediante el anticuerpo de referencia. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competición ejemplar se incubaba el antígeno inmovilizado (por ejemplo, CD3) en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno (por ejemplo, anticuerpo V9, descrito en el documento US 6.054.297) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba el antígeno inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con relación a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión al antígeno. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T preparadas como se describe en el presente documento se pueden purificar por técnicas conocidas en la técnica tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobia, hidrofilia, etc., y serán evidentes para los expertos en la técnica. Para la purificación por cromatografía de afinidad se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. Por ejemplo, para la purificación por cromatografía de afinidad de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describe en el presente documento se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se pueden usar la cromatografía de afinidad con proteína A o G y la cromatografía de exclusión por tamaño secuenciales para aislar una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T esencialmente como se describe en los ejemplos. Se puede determinar la pureza de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T por cualquiera de una variedad de procedimientos analíticos bien conocidos, incluyendo electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares. Por ejemplo, se demostró que las proteínas de fusión de la cadena pesada expresadas como se describe en los ejemplos estaban intactas y apropiadamente ensambladas como se demostró por SDS-PAGE reductora (véase, por ejemplo, la figura 4). Se resolvieron tres bandas aproximadamente a Mr 25.000, Mr 50.000 y Mr 75.000, correspondientes a los pesos moleculares predichos de la proteína de fusión de cadena ligera, cadena pesada y cadena pesada/cadena ligera de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T.

Ensayos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T por un receptor de Fc o un antígeno diana se puede determinar de acuerdo con los procedimientos expuestos en los ejemplos por resonancia de plasmón superficial (SPR), usando instrumentación estándar tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores o proteínas diana tales como los que se pueden obtener por expresión recombinante. De forma alternativa, la unión de moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T para diferentes receptores o antígenos diana se puede evaluar usando líneas celulares que expresan el receptor o antígeno diana particular, por ejemplo, por citometría de flujo (FACS). Un modo de realización ilustrativo y ejemplar específico para medir la afinidad de unión se describe en lo que sigue y en los ejemplos a continuación.

De acuerdo con un modo de realización, se mide la K_D mediante resonancia de plasmón superficial usando una máquina BIACORE® T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

Para analizar la interacción entre la porción Fc y los receptores de Fc, se captura el receptor de Fc recombinante con marca de His por un anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) inmovilizado en chips CM5 y se usan las construcciones biespecíficas como analitos. En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el anticuerpo anti-Penta-His con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, a 40 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para lograr aproximadamente 6500 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del ligando, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Posteriormente, se captura el receptor de Fc durante 60 s a 4 o 10 nM. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie 1:4 de la construcción biespecífica (intervalo entre 500 nM y 4000 nM) en HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 30 µl/min durante 120 s.

Para determinar la afinidad por el antígeno diana, se capturan las construcciones biespecíficas por un anticuerpo específico anti-Fab humano (GE Healthcare) que se inmoviliza en una superficie de chip de sensor CM5 activado como se describe para el anticuerpo anti-Penta-His. La cantidad final de proteína acoplada es de aproximadamente 12000 UR. Se capturan las construcciones biespecíficas durante 90 s a 300 nM. Se pasan los antígenos diana a través de cubetas de lectura durante 180 s a un intervalo de concentración de 250 a 1000 nM con un caudal de 30 µl/min. Se monitoriza la disociación durante 180 s.

Se corrigen las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Se usó la respuesta en situación de equilibrio para derivar la constante de disociación K_D por ajuste de curva no lineal de la isoterma de unión de Langmuir. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación BIACORE® T100 versión 1.1.1) ajustando simultáneamente los sensores de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Ensayos de actividad

Se puede medir la actividad biológica de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento por diversos ensayos como se describe en los ejemplos. Las actividades biológicas pueden incluir, por ejemplo, la inducción de proliferación de linfocitos T, la inducción de señalización en linfocitos T, la inducción de expresión de marcadores de activación en linfocitos T, la inducción de secreción de citocinas por linfocitos T, la inducción de lisis de células diana tales como células tumorales y la inducción de regresión tumoral y/o la mejora de la supervivencia.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos a continuación. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Se proporciona además un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento en una forma adecuada para su administración *in vivo*, comprendiendo el procedimiento (a) obtener una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento, y (b) formular la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, con lo que se formula una preparación de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para su administración *in vivo*.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T disueltas o dispersadas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son, en general, no tóxicas para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, es decir que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción indeseable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y opcionalmente un ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para administración animal (por ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenia, seguridad general y pureza según se requiere por la Oficina de Normas biológicas de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferentes son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos los disolventes, tampones, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizantes de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como se conocerá por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La composición puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o aerosol, y si es necesario que sea estéril para dichas vías de administración como inyección. Las moléculas de unión a antígeno biespecífico activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intraesplénica, intrarrenal, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada, bañando células diana directamente, a través de un catéter, a través de un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otro procedimiento o cualquier combinación de lo anterior como sería conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed. Mack Printing Company, 1990). La administración parenteral, en particular la inyección intravenosa, se usa más comúnmente para administrar moléculas polipeptídicas tales como las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento.

Las composiciones parenterales incluyen aquellas diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para inyección, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De forma alternativa, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes de su uso. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados a continuación, según se requiera. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. En general, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferentes son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido previamente filtrado estéril del mismo. Se debe tamponar adecuadamente el medio líquido si es necesario y volver isotónico primero el diluyente líquido antes de la inyección con solución salina o glucosa suficiente. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que se debe mantener al mínimo la contaminación por endotoxinas hasta un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina,

arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano, o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.^a ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En determinados modos de realización, se puede conseguir una absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Además de las composiciones descritas previamente, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T también se pueden formular como preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se pueden formular con materiales hidrófobos o poliméricos adecuados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento se pueden fabricar por medio de procesos de mezclado, disolución, emulsión, encapsulado, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se pueden formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que retienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

Procedimientos terapéuticos y composiciones

Se puede usar cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T proporcionadas en el presente documento en procedimientos terapéuticos. Se pueden usar moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describen en el presente documento como agentes inmunoterápicos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

Para su uso en procedimientos terapéuticos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento se formularían, dosificarían y administrarían de una manera consecuente con una buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

En un aspecto se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso como medicamento. En otros aspectos se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En determinados modos de realización se proporcionan moléculas de

unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento. En un modo de realización se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En determinados modos de realización se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En otros modos de realización se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en la inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. En determinados modos de realización se proporciona una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento para su uso en un procedimiento de inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano. En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En un modo de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. En otro modo de realización, el medicamento es para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. Todavía en otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de inducción de lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inducir la lisis de una célula diana. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento. En un modo de realización se administra una composición a dicho individuo, que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento en una forma farmacéuticamente aceptable. En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo. En un modo de realización particular, la enfermedad es cáncer. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un antineoplásico si la enfermedad que se va a tratar es cáncer. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral. En un modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto una célula diana con una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento en presencia de un linfocito T, en particular un linfocito T citotóxico. En otro aspecto se proporciona un procedimiento para inducir la lisis de una célula diana, en particular una célula tumoral, en un individuo. En un modo de realización este tipo, el procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T para inducir la lisis de una célula diana. En un modo de realización, un "individuo" es un ser humano.

En determinados modos de realización, la enfermedad que se va a tratar es un trastorno proliferativo, en particular cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer gástrico, cáncer de próstata, neoplasia hemática, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de huesos y cáncer de riñón. Otros trastornos de proliferación celular que se pueden tratar usando una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, neoplasias localizadas en el(los)/la(s): abdomen, hueso, mama, aparato digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenal, paratiroidea, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroidea), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, aparato genital femenino, piel, tejidos blandos, bazo, región torácica y sistema urogenital. También se incluyen afecciones o lesiones precancerosas y metástasis

de cáncer. En determinados modos de realización, el cáncer se elige del grupo que consiste en cáncer de células renales, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello. Un experto en la técnica reconoce fácilmente que en muchos casos la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede que no proporcione una cura, sino que solo proporciona un beneficio parcial. En algunos modos de realización, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por tanto, en algunos modos de realización, una cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es típicamente un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunos modos de realización, una cantidad eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento se administra a una célula. En otros modos de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento se administra a un individuo para el tratamiento de enfermedad.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento (cuando se usa sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, la gravedad y evolución de la enfermedad, si la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, intervenciones terapéuticas previas o coincidentes, la anamnesis y respuesta del paciente a la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T, y el criterio del médico especialista. El profesional responsable de su administración determinará, en cualquier caso, la concentración del/de los ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto individual. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos de tiempo, administración con inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T estaría en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg peso corporal, etc., en base a los números descritos anteriormente. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento se usarán en general en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. Para su uso para tratar o prevenir un estado de enfermedad, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o se aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, en especial en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para la administración sistémica, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. A continuación, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación que incluye la Cl_{50} como se determina en cultivo celular. Se puede usar dicha información para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

También se pueden estimar dosificaciones iniciales a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en base a los datos en animales.

La cantidad e intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar concentraciones plasmáticas de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que sean suficientes para mantener un efecto terapéutico. Las dosificaciones de paciente habituales para administración por inyección varían de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg/día, típicamente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Se pueden lograr concentraciones plasmáticas terapéuticamente eficaces administrando dosis múltiples cada día. Las concentraciones en plasma se pueden medir, por ejemplo, por HPLC.

En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la técnica podrá optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

Una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento proporcionará en general beneficio terapéutico sin provocar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales de experimentación. Se pueden usar ensayos de cultivo celular y estudios en animales para determinar la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de una población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de una población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la proporción DL_{50}/DE_{50} . Son preferentes las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T que presentan índices terapéuticos grandes. En un modo de realización, la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento presenta un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificaciones adecuadas para su uso en seres humanos. Preferentemente, la dosificación se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la forma de dosificación empleada, la vía de administración utilizada, la afección del sujeto y similares. La formulación exacta, vía de administración y dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Cap. 1, p. 1).

El médico especialista para pacientes tratados con moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T como se describe en el presente documento sabrá cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad, a disfunción orgánica y similares. A la inversa, el médico especialista también sabrá ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el abordaje del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar, con la vía de administración y similares. La gravedad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, por procedimientos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y quizás la frecuencia de dosis también variarán de acuerdo con la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T descritas en el presente documento se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes en el tratamiento. Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. El término "agente terapéutico" engloba cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesita dicho tratamiento. Dicho agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la indicación particular que se está tratando, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular o un agente que incrementa la sensibilidad de las células a los inductores apoptóticos. En un modo de realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un alterador de los microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasas, un intercalador de ADN, un agente alquilante, un tratamiento hormonal, un inhibidor de cinasas, un antagonista de receptores, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente antiangiogénico.

Dichos otros agentes están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T usada, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas activadoras de linfocitos T se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente como apropiada.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en composiciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso se puede producir la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T descrita en el presente documento antes de, simultáneamente a y/o después de la administración del adyuvante y/o agente terapéutico adicional. Las moléculas de unión a antígeno biespecífico activador de linfocitos T como se describe en el presente documento también se pueden usar en combinación con radioterapia.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T como se describe en el presente documento; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en este modo de realización de la divulgación puede comprender además un prospecto del envase que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones como se describe en el presente documento. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Procedimientos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A. *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., publicación de NIH n.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Se determinaron secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra.

Síntesis génica

Se generaron segmentos de genes deseados, cuando se requirió, por PCR usando moldes apropiados o bien se sintetizaron por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR por síntesis génica automatizada. En casos donde no estaba disponible ninguna secuencia génica exacta, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos en base a las secuencias de los homólogos más cercanos y se aislaron

los genes por RT-PCR del ARN que se origina en el tejido apropiado. Se clonaron los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasas de restricción singulares en vectores de clonación/secuenciación estándar. Se purificó el ADN plasmídico de bacterias transformadas y se determinó la concentración por espectroscopía UV. Se confirmó la secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados por secuenciación de ADN. Se diseñaron segmentos génicos con sitios de restricción adecuados para permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Se diseñaron todas las construcciones con una secuencia de ADN del extremo 5' que codifica un péptido líder que se dirige a proteínas para su secreción en células eucariotas. Los ejemplos de péptidos líder y secuencias de polinucleótidos que los codifican se representan en SEQ ID NO: 108-116.

Aislamiento de linfocitos pan T primarios humanos de PBMC

Los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. En resumen, la sangre se diluyó con PBS estéril y se colocó cuidadosamente en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, H8889). Después de la centrifugación durante 30 minutos a 450 x g a temperatura ambiente (freno desconectado), se desechó la parte del plasma que se encontraba por encima de la interfase que contenía los PBMC. Los PBMC se transfirieron a nuevos tubos Falcon de 50 ml y los tubos se rellenaron con PBS hasta un volumen total de 50 ml. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 400 x g (freno activado). El sobrenadante se desechó y el sedimento de PBMC se lavó dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación a 4 °C durante 10 minutos a 350 x g). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en un medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, 5 % de CO₂ en la incubadora hasta el inicio del ensayo.

El enriquecimiento de linfocitos T a partir de PBMC se realizó usando el kit II de aislamiento de linfocitos pan T (Miltenyi Biotec n.º 130-091-156), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los sedimentos celulares se diluyeron en 40 µl de tampón frío por 10 millones de células (PBS con BSA al 0,5 %, EDTA 2 mM, filtrado estéril) y se incubaron con 10 µl de cóctel de biotina-anticuerpo por 10 millones de células durante 10 min a 4 °C. Se añadieron 30 µl de tampón frío y 20 µl de microesferas magnéticas anti-biotina por 10 millones de células, y la mezcla se incubó durante otros 15 min a 4 °C. Las células se lavaron añadiendo 10-20x el volumen actual de tampón y una etapa de centrifugación posterior a 300 x g durante 10 min. Se resuspendieron hasta 100 millones de células en 500 µl de tampón. La separación magnética de linfocitos pan T humanos no marcados se realizó usando columnas LS (Miltenyi Biotec n.º 130-042-401) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de linfocitos T resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en un medio AIM-V a 37 °C, 5 % de CO₂ en la incubadora hasta el inicio del ensayo (no más de 24 h).

Aislamiento de linfocitos T indiferenciados primarios humanos de PBMC

Los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de bancos de sangre locales o de sangre fresca de donantes humanos sanos. El enriquecimiento de linfocitos T a partir de PBMC se realizó usando el kit de aislamiento de linfocitos T indiferenciados CD8⁺ de Miltenyi Biotec (n.º 130-093-244), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero omitiendo la última etapa de aislamiento de los linfocitos T CD8⁺ (véase también la descripción para el aislamiento de linfocitos pan T humanos primarios).

Aislamiento de linfocitos pan T murinos de esplenocitos

Se aislaron bazoos de ratones C57BL/6, se transfirieron a un tubo en C GentleMACS (Miltenyi Biotec n.º 130-093-237) que contenía tampón MACS (PBS + BSA al 0,5 % + EDTA 2 mM) y se disociaron con el disociador GentleMACS para obtener suspensiones de células sueltas según las instrucciones del fabricante. La suspensión celular se pasó a través de un filtro de separación previa para eliminar las partículas de tejido no disociadas restantes. Después de la centrifugación a 400 x g durante 4 min a 4 °C, se añadió tampón de lisis ACK para lisar los eritrocitos (incubación durante 5 min a temperatura ambiente). Las células restantes se lavaron con tampón MACS dos veces, se contaron y se usaron para el aislamiento de linfocitos pan T murinos. La selección (magnética) negativa se realizó usando el kit de aislamiento de linfocitos pan T de Miltenyi Biotec (n.º 130-090-861), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La población de linfocitos T resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos adicionales.

Aislamiento de PBMC primarios de macaco cangrejero de sangre heparinizada

Los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad a partir de sangre fresca de donantes sanos de macaco cangrejero, como sigue: la sangre heparinizada se diluyó 1:3 con PBS estéril, y el medio Lymphoprep (Axon Lab n.º 1114545) se diluyó al 90 % con PBS estéril. Dos volúmenes de la sangre diluida se colocaron en una capa sobre un volumen del gradiente de densidad diluido y la fracción de PBMC se separó mediante centrifugación durante 30 min a 520 x g, sin freno, a temperatura

ambiente. La banda de PBMC se transfirió a un tubo Falcon nuevo de 50 ml y se lavó con PBS estéril por centrifugación durante 10 min a 400 x g a 4 °C. Se realizó una centrifugación a baja velocidad para eliminar las plaquetas (15 min a 150 x g, 4 °C), y la población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se usó inmediatamente para ensayos adicionales.

5

Células diana

Para la evaluación de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas dirigidas a MCSP se usaron las siguientes líneas celulares tumorales: la línea celular de melanoma humano WM266-4 (ATCC n.º CRL-1676), derivada de un sitio metastásico de un melanoma maligno y que expresa niveles altos de MCSP humano; la línea celular de melanoma humano MV-3 (una donación del The Radboud University Nijmegen Medical Centre), que expresa niveles medios de MCSP humano; la línea celular de melanoma maligno humano (tumor primario) A375 (ECACC n.º 88113005) que expresa niveles altos de MCSP; la línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116 (ATCC n.º CCL-247) que no expresa MCSP; y la línea celular de adenocarcinoma de colon caucásico humano LS180 (ECACC n.º 87021202) que no expresa MCSP.

10

15

Para la evaluación de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas dirigidas a CEA se usaron las siguientes líneas celulares tumorales: la línea celular de cáncer gástrico humano MKN45 (DSMZ n.º ACC 409), que expresa niveles muy altos de CEA humano; la línea celular de adenocarcinoma de páncreas humano HPAF-II (donación de Roche Nutley), que expresa niveles altos de CEA humano; la línea celular de adenocarcinoma pancreático primario humano BxPC-3 (ECACC n.º 93120816), que expresa niveles medios de CEA humano; la línea celular de adenocarcinoma de colon caucásico femenino humano LS-174T (ECACC n.º 87060401), que expresa niveles medios de CEA humano; la línea celular de adenocarcinoma de páncreas humano ASPC-1 (ECACC n.º 96020930) que expresa niveles bajos de CEA humano; la línea celular de carcinoma pancreático epitelioide humano Panc-1 (ATCC n.º CRL-1469), que expresa niveles (muy) bajos de CEA humano; la línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116 (ATCC n.º CCL-247) que no expresa CEA; una línea celular epitelial basal alveolar adenocarcinómica humana A549-huCEA que se transfirió de forma estable en las instalaciones propias para que expresara CEA humano; y una línea celular de carcinoma de colon murino MC38-huCEA, que se genomanipuló en las instalaciones propias para que expresara de manera estable CEA humano.

20

25

30

Además, se usó una línea celular de leucemia de linfocitos T humanos, Jurkat (ATCC n.º TIB-152), para evaluar la unión de diferentes construcciones biespecíficas a CD3 humanos en células.

35

Ejemplo 1

Maduración por afinidad del anticuerpo anti-MCSP M4-3 / ML2

La maduración por afinidad se realizó por medio del procedimiento de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. Para ello, la variante de la cadena pesada M4-3 y la variante de la cadena ligera ML2 se clonaron en un vector fagómico, similar a los descritos por Hoogenboom, (Hoogenboom *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133-4137). Los residuos que se iban a aleatorizar se identificaron generando primero un modelo 3D de ese anticuerpo por medio del modelado de homología clásico y a continuación identificando los residuos accesibles al disolvente de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y ligera. Los oligonucleótidos con aleatorización basada en la síntesis de trinucleótidos como se muestra en la tabla 1 se adquirieron de Ella Biotech (Múnich, Alemania). Se generaron tres subcolecciones independientes por medio de PCR clásica, y comprendieron la aleatorización en CDR-H1 conjuntamente con CDR-H2, o CDR-L1 conjuntamente con CDR-L2. CDR-L3 se aleatorizó en un enfoque separado. Los fragmentos de ADN de esas colecciones se clonaron en el fagómico por medio de digestión de restricción y ligación, y posteriormente se sometieron a electroporación en bacterias TG1.

40

45

50

Selección de colecciones

Las variantes de anticuerpo así generadas se presentaron en una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas en cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se cribaron a continuación para determinar sus actividades biológicas (por ejemplo, afinidad de unión) y los candidatos que tenían una o más actividades mejoradas se usaron para un desarrollo posterior. Los procedimientos para preparar colecciones de presentación en fagos se pueden encontrar en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073-1093.

55

60

65

Las selecciones con todas las colecciones con maduración de la afinidad se llevaron a cabo en solución de acuerdo con el siguiente procedimiento: 1. unión de ~10¹² partículas de fagómicos de cada colección de maduración de la afinidad a hu-MCSP(dominio D3)-avi-his biotinilado 100 nM (SEQ ID NO: 118) durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml; 2. captura de hu-MCSP(dominio D3)-avi-his biotinilado y partículas de fagos específicamente unidas mediante la adición de 5,4 x 10⁷ microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina durante 10 min; 3. lavado de las microesferas usando 5-10 x 1 ml de PBS/Tween20 y 5-10 x 1 ml de PBS; 4. elución de las partículas de fagos mediante la adición de 1 ml de TEA (trietilamina) 100 mM durante 10 min y neutralización mediante la adición

de 500 µl de Tris/HCl 1 M a pH 7,4; y 5. reinfeksi3n por bacterias *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial, infecci3n por el fago auxiliar VCSM13 y posterior precipitaci3n en PEG/NaCl de part3culas de fag3midos para su uso en las rondas de selecci3n posteriores. Las selecciones se llevaron a cabo en 3-5 rondas usando concentraciones de ant3geno constantes o decrecientes (de 10⁻⁷ M a 2 x 10⁻⁹ M). En la ronda 2, la captura de los complejos ant3geno-fago se realiz3o usando placas de neutravidina en lugar de microesferas de estreptavidina. Las prote3nas de uni3n espec3ficas se identificaron mediante ELISA como sigue: Se recubrieron 100 µl de hu-MCSP(dominio D3)-avi-his biotinilado 10 nM por pocillo en placas con neutravidina. Se a3adieron sobrenadantes bacterianos que conten3an Fab y se detectaron los Fab de uni3n por medio de sus marcas Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones positivos en ELISA se expresaron bacterianamente como fragmentos Fab solubles en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes se sometieron a un experimento de cribado cin3tico mediante an3lisis SPR usando ProteOn XPR36 (BioRad). Se identificaron los clones que expresan Fab con las constantes de afinidad m3s altas y se secuenciaron los fag3midos correspondientes.

Tabla 1 (Cys y Met se excluyeron siempre. Lys se excluy3o tambi3n en aquellos casos en los que el oligonucle3tido era un cebador inverso)

Posici3n	Aleatorizaci3n
Cadena pesada	
CDR1	
Ser31	S (40 %), resto (60 %, 4 % cada uno)
Gly32	G (40 %), resto (60 %, 4 % cada uno).
Tyr33	Y (40 %), resto (60 %, 4 % cada uno)
Tyr34	Y (40 %), resto (60 %, 4 % cada uno)
CDR2	
Tyr50	Y (40 %), (F, W, L, A, I 30 %, 6 % cada uno), resto (30 %, 2,5 % cada uno)
Thr52	T (60 %), resto (40 %, 2,5 % cada uno)
Tyr53	Y (40 %), resto (60 %, 3,8 % cada uno)
Asp54	D (40 %), resto (60 %, 3,8 % cada uno)
Ser56	S (40 %), resto (60 %, 3,8 % cada uno)
Cadena ligera	
CDR1	
Gln27	Q (40 %), (E, D, N, S, T, R 40 %, 6,7 % cada uno), resto (20 % en total, 2,2 % cada uno)
Gly28	G (40 %), (N, T, S, Q, Y, D, E 40 %, 5,7 % cada uno), resto (20 %, 2,5 % cada uno)
Asn31	N (40 %), (S, T, G, Q, Y, D, E, R 50 %, 6,3 % cada uno), resto (10 %, 1,4 % cada uno)
Tyr32	Y (40 %), (W, S, R 30 %, 10 % cada uno), resto (30 %, 2,3 % cada uno)
CDR2	
Tyr50	Y (70 %), (E, R, K, A, Q, T, S, D, G, W, F 30 %, 2,7 % cada uno)
Thr51	T (50 %), (S, A, G, N, Q, V 30 %, 5 % cada uno), resto (20 %, 2 % cada uno)
Ser52	S (50 %), resto (50 %, 3,1 % cada uno)
Ser53	S (40 %), (N, T, Q, Y, D, E, I 40 %, 5,7 % cada uno), resto (20 %, 2,2 % cada uno)
CDR3	
Tyr91	Y (50 %), resto (50 %, 3,1 % cada uno)
Ser92	S (50 %), (N, Q, T, A, G 25 %, 5 % cada uno), resto (25 %, 2,3 % cada uno)
Lys93	K (50 %), S (5 %), T (5 %), N (5 %), resto (35 %, 2,7 % cada uno)
Leu94	L (50 %), (Y, F, S, I, A, V 30 %, 5 % cada uno), resto (20 %, 2 % cada uno)
Pro95	P (50 %), (S, A 20 %, 10 % cada uno), resto (30 %, 2,1 % cada uno)
Trp96	W (50 %), (Y, R, L 15 %, 5 % cada uno), resto (35 %, 2,5 % cada uno)

La figura 2 muestra una alineaci3n de clones anti-MCSP de afinidad madurada en comparaci3n con el clon original no madurado (M4-3 ML2). La aleatorizaci3n de la cadena pesada se realiz3o solo en CDR1 y 2. La aleatorizaci3n de la cadena ligera se realiz3o en CDR1 y 2 e, independientemente, en CDR3.

Durante la selecci3n, se produjeron algunas mutaciones en las regiones estructurales como F71Y en el clon G3 o Y87H en el clon E10.

Producci3n y purificaci3n de IgG₁ humana

Se subclonaron las secuencias de ADN de la regi3n variable de la cadena pesada y ligera de las variantes de afinidad madurada sin cambio del marco de lectura con la cadena pesada constante o bien la cadena ligera constante preinsertada en el respectivo vector de expresi3n de mam3fero receptor. La expresi3n del anticuerpo

estaba dirigida por un promotor MPSV y lleva una secuencia señal poliA sintética en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contenía una secuencia OriP de EBV.

5 Se produjo la molécula cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina (PEI). Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:1. Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión en medio de cultivo CD CHO libre de suero. Para la producción en un matraz de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución PEI, la mezcla se sometió a agitación vorticial durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a un matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadió ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % (Lonza). Después de un cultivo de 7 días, se recogió el sobrenadante para la purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm) y se añadió ácido de sodio hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

20 La proteína secretada se purificó de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. El sobrenadante se cargó en una columna HiTrap Protein A HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína diana se eluyó usando un gradiente en 20 volúmenes de columna desde citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5 hasta citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 2,5. Se neutralizó la solución de proteína añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8. Se concentró la proteína diana y se filtró antes de su carga en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, solución de cloruro de sodio 140 mM a pH 6,0.

30 Se determinó la concentración de proteína de las muestras de proteínas purificadas midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos. Se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas por análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µg de muestra para los análisis. Se analizó el contenido en agregado de las muestras de anticuerpo usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monohidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

Tabla 2. Producción y purificación de IgG anti-MCSP de afinidad madurada

Construcción	Rendimiento [mg/l]	HMW [%]	LMW [%]	Monómero [%]
M4-3(C1) ML2(G3)	43,9	0	0	100
M4-3(C1) ML2(E10)	59,5	0	0	100
M4-3(C1) ML2(C5)	68,9	0	0,8	99,2

40

Determinación de afinidad

Análisis ProteOn

45 La K_D se midió por resonancia de plasmón superficial usando una máquina ProteOn XPR36 (BioRad) a 25 °C con anticuerpo de captura específico de fragmento anti-F(ab')₂ humano (Jackson ImmunoResearch n.º 109-005-006) inmovilizado por acoplamiento de amina en chips CM5 y posterior captura de los Fab del sobrenadante bacteriano o de preparaciones de Fab purificadas. En resumen, se activaron chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, GE Healthcare) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El anticuerpo de captura específico de fragmento anti-F(ab')₂ humano se diluyó con acetato de sodio 10 mM, pH 5,0 a 50 µg/ml antes de la inyección a un caudal de 10 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10.000 unidades de respuesta (UR) de anticuerpo de captura acoplado. Después de la inyección del anticuerpo de captura, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron Fab de sobrenadante bacteriano o Fab purificados a un caudal de 10 µl/minuto durante 300 s y una disociación de 300 s para la estabilización de la línea base de captura. Los niveles de captura estaban en el intervalo de 100-500 UR. En una etapa posterior, se inyectó el analito MCSP (dominio D3)-avi-his humano como una concentración única o bien como una serie de concentraciones (dependiendo de la afinidad del clon en un intervalo entre 100 nM y 250 pM) diluido en HBS-EP+ (GE Healthcare, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) a 25 °C a un caudal de 50 µl/min. 60 La superficie del chip sensor se regeneró mediante inyección de glicina a pH 1,5 durante 30 s a 90 µl/min, seguido de inyección de NaOH durante 20 s al mismo caudal. Se calcularon las velocidades de asociación (k_{as}) y

velocidades de disociación (K_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación ProteOn XPR36 o programa informático Scrubber (BioLogic)) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la proporción K_{dis}/K_{as} . Estos datos se usaron para determinar la afinidad de unión comparativa de las variantes de afinidad madurada con el anticuerpo original. La tabla 3a muestra los datos generados a partir de estos ensayos.

Se eligieron G3, E10, C5 para la cadena ligera y D6, A7, B7, B8, C1 para la cadena pesada para la conversión en formato de IgG₁ humana. Dado que CDR1 y 2 de la cadena ligera se aleatorizaron independientemente de CDR3, las CDR obtenidas se combinaron durante la conversión de IgG.

En el formato de IgG, las afinidades se midieron nuevamente con el antígeno MCSP humano (SEQ ID NO: 118), además también del homólogo de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 117).

El procedimiento usado fue exactamente como se describe para los fragmentos Fab, usando solo IgG purificada de la producción en mamífero.

Tabla 3a. Clones de MCSP de afinidad madurada: datos de Proteon

Variante	MCSP humano K_D Fab	MCSP humano K_D IgG	MCSP macaco K_D IgG	MCSP humano K_D IgG	MCSP macaco K_D IgG
	Datos de afinidad generados por ProteOn			Afinidad de unión comparativa: veces de incremento con respecto al original	
M4-3/ML2 original	5×10^{-9}	2×10^{-9}	2×10^{-9}		
M4-3/ML2(G3)	4×10^{-10}	3×10^{-10}	6×10^{-10}	6,7	3,3
M4-3/ML2(E10)	7×10^{-10}	1×10^{-9}	2×10^{-9}	2,0	1,0
M4-3/ML2(E10/G3)		4×10^{-10}	9×10^{-10}	5,0	2,2
M4-3/ML2(C5)	7×10^{-10}	4×10^{-10}	1×10^{-9}	5,0	2,0
M4-3/ML2(C5/G3)		7×10^{-10}	1×10^{-9}	2,9	2,0
M4-3(D6)/ML2	2×10^{-9}	4×10^{-10}	1×10^{-9}	5,0	2,0
M4-3(A7)/ML2	2×10^{-11}	8×10^{-10}	1×10^{-9}	2,5	2,0
M4-3(B7)/ML2		5×10^{-10}	7×10^{-10}	4,0	2,9
M4-3(B8)/ML2	3×10^{-10}	9×10^{-10}	1×10^{-9}	2,2	2,0
M4-3(C1)/ML2	6×10^{-10}	9×10^{-10}	8×10^{-10}	2,2	2,5
M4-3(C1)/ML2(G3)		7×10^{-11}	2×10^{-10}	28,6	10,0
M4-3(C1)/ML2(E10)		5×10^{-10}	6×10^{-10}	4,0	3,3
M4-3(A7)/ML2(G3)		7×10^{-11}	2×10^{-10}	28,6	10,0
M4-3(A7)/ML2(E10)		3×10^{-10}	7×10^{-10}	6,7	2,9
M4-3(C1)/ML2(C5)		2×10^{-10}	3×10^{-10}	10,0	6,7
M4-3(A7)/ML2(C5)		7×10^{-11}	2×10^{-10}	28,6	10,0

20 Determinación de afinidad por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando Biacore T200

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar la afinidad y la avidéz de las IgG de afinidad madurada se realizaron en un Biacore T200 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo / Alemania).

Para analizar la avidéz de la interacción de diferentes IgG anti-MCSP por MCSP D3 humano y de macaco cangrejero, se realizó el acoplamiento directo de alrededor de 9.500 unidades de resonancia (UR) del anticuerpo anti-Penta His (Qiagen) en un chip CM5 a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Friburgo / Alemania). Los antígenos se capturaron durante 60 s a 30 nM con 10 μ l/min, respectivamente. Las IgG se pasaron a una concentración de 0,0064-100 nM con un caudal de 30 μ l/min a través de las cubetas de lectura durante 280 s. Se monitorizó la disociación durante 180 s. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Aquí, las IgG se pasaron sobre una superficie con anticuerpo anti-Penta His inmovilizado, pero en el que se había inyectado HBS-EP en lugar de MCSP D3 humano o MCSP D3 de macaco cangrejero. Para las mediciones de afinidad, se capturaron las IgG en la superficie de un chip sensor CM5 con anti-Fc humano inmovilizado. La IgG de captura se acopló a la superficie del chip sensor por inmovilización directa de alrededor de 9.500 unidades de resonancia (UR) a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Friburgo / Alemania). Las IgG se capturaron durante 25 s a 10 nM con 30 μ l/min. Se pasaron MCSP D3 humano y de macaco cangrejero a una concentración de 2-500 nM con un caudal de 30 μ l/min a través de las cubetas de lectura durante 120 s. Se monitorizó la disociación durante 60 s. La asociación y la disociación para una concentración de 166 y 500 nM se monitorizaron durante 1200 y 600 s, respectivamente. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en la cubeta de lectura de referencia. Aquí, los antígenos se pasaron sobre una superficie con anticuerpo anti-Fc humano inmovilizado, pero en el que se había inyectado HBS-EP en lugar de IgG anti-MCSP.

Las constantes cinéticas se derivaron usando el programa informático de evaluación Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala / Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica. Se confirmó una mayor afinidad por el MCSP D3 humano y de macaco cangrejero mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial usando Biacore T200. Además, las mediciones de avidéz mostraron un incremento de hasta 3 veces en la unión bivalente (tabla 3b).

Tabla 3b. Afinidad y avidéz de las IgG anti-MCSP por MCSP-D3 humano y MCSP-D3 de macaco cangrejero

K _D en nM T = 25 °C	MCSP D3 humano		MCSP D3 de macaco	
	Afinidad	Avidéz	Afinidad	Avidéz
M4-3(C1) ML2(G3)	1,8	0,0045	1,4	0,0038
M4-3(C1) ML2(E10)	4,6	0,0063	3,8	0,0044
M4-3(C1) ML2(C5)	1,8	0,0046	1,3	0,0044
M4-3 ML2 (original)	8,6	0,0090	11,4	0,0123

Ejemplo 2

Preparación de TCB MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida) que contiene M4-3(C1) ML2(G3) como anticuerpo anti-MCSP y CH2527 humanizado como anticuerpo anti-CD3

Se subclonaron las secuencias de ADN de la región variable de la cadena pesada y ligera sin cambio del marco de lectura con la cadena pesada constante o bien la cadena ligera constante preinsertada en el respectivo vector de expresión de mamífero receptor. La expresión del anticuerpo estaba dirigida por un promotor MPSV y lleva una secuencia señal poliA sintética en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de EBV.

Se produjo la molécula cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina (PEI). Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:2:1:1 ("vector de cadena pesada Fc(oyal): "vector de cadena ligera": "vector de cadena ligera Crossfab": "vector de cadena pesada Fc(botón)-FabCrossfab").

Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión en medio de cultivo CD CHO libre de suero. Para la producción en un matraz de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución PEI, la mezcla se sometió a agitación vorticial durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadió ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % (Lonza). Después de un cultivo de 7 días, se recogió el sobrenadante para la purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm) y se añadió acida de sodio hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

La proteína secretada se purificó de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. El sobrenadante se cargó en una columna HiTrap Protein A HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína diana se eluyó usando un gradiente en 20 volúmenes de columna desde citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5 hasta citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 2,5. Se neutralizó la solución de proteína añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8. Se concentró la proteína diana y se filtró antes de su carga en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, solución de cloruro de sodio 140 mM a pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína de las muestras de proteínas purificadas midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos.

Se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas por análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µg de muestra para los análisis.

Se analizó el contenido en agregado de las muestras de anticuerpo usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

5 **Tabla 4a. Resumen de producción y purificación de TCB MCSP**

Construcción	Valor [mg/l]	Rendimiento [mg/l]	Agregado después de 1. ^a etapa de purificación [%]	HMW [%]	LMW [%]	Monómero [%]
TCB MCSP	157	0,32	32	3,3	0	96,7

La figura 3 muestra un dibujo esquemático de la molécula TCB MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida).

10 La figura 4 y la tabla 4b muestran los análisis CE-SDS de la molécula TCB MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida, SEQ ID NO: 12, 53, 54 y 55).

Tabla 4b. Análisis CE-SDS de TCB MCSP

	Pico	kDa	Cadena correspondiente
TCB MCSP no reducida (A)	1	206,47	
TCB MCSP reducida (B)	1	29,15	ML2 (C1) de cadena ligera
	2	37,39	huCH2527 de cadena ligera
	3	66,07	Fc(ojal)
	4	94,52	Fc(botón)

15

Ejemplo 3

Preparación de TCB CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida) que contiene CH1A1A 98/99 2F1 como anticuerpo anti-CEA y CH2527 humanizado como anticuerpo anti-CD3

20

Se subclonaron las secuencias de ADN de la región variable de la cadena pesada y ligera sin cambio del marco de lectura con la cadena pesada constante o bien la cadena ligera constante preinsertada en el respectivo vector de expresión de mamífero receptor. La expresión del anticuerpo estaba dirigida por un promotor MPSV y lleva una secuencia señal poliA sintética en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de EBV.

25

Se produjo la molécula cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina (PEI). Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:2:1:1 ("vector de cadena pesada Fc(ojal)": "vector de cadena ligera": "vector de cadena ligera Crossfab": "vector de cadena pesada Fc(botón)-FabCrossfab").

30

Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión en medio de cultivo CD CHO libre de suero. Para la producción en un matraz de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución PEI, la mezcla se sometió a agitación vorticial durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadió ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % (Lonza). Después de un cultivo de 7 días, se recogió el sobrenadante para la purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm) y se añadió acida de sodio hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

45

La proteína secretada se purificó de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. El sobrenadante se cargó en una columna HiTrap Protein A HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína diana se eluyó usando un gradiente en 20 volúmenes de columna desde citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5 hasta citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 2,5. Se neutralizó la solución de proteína añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8. Se concentró la proteína diana y se filtró antes de su carga en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, solución de cloruro de sodio 140 mM a pH 6,0.

55

Se determinó la concentración de proteína de las muestras de proteínas purificadas midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos.

5 Se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas por análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µg de muestra para los análisis.

10 Se analizó el contenido en agregado de las muestras de anticuerpo usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

Tabla 5. Resumen de producción y purificación de TCB CEA

Construcción	Valor [mg/l]	Rendimiento [mg/l]	Agregado después de 1. ^a etapa de purificación [%]	HMW [%]	LMW [%]	Monómero [%]
TCB CEA	66	0,31	21,5	8,1	4,4	87,5

15 La figura 5 muestra un dibujo esquemático de la molécula TCB CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida).

La figura 6 y la tabla 6 muestran los análisis CE-SDS de la molécula TCB CEA (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida, SEQ ID NO: 22, 56, 57 y 58).

20 **Tabla 6. Análisis CE-SDS de TCB CEA**

	Pico	kDa	Cadena correspondiente
TCB CEA no reducida (A)	1	205,67	Molécula correcta
TCB CEA reducida (B)	1	28,23	CH1A1A 98/99 x 2F1 de cadena ligera
	2	36,31	CH2527 de cadena ligera
	3	63,48	Fc(ojal)
	4	90,9	Fc(botón)

25 En un procedimiento de purificación alternativo, la TCB CEA se capturó del sobrenadante de fermentación recogido y se aclaró por cromatografía de afinidad con proteína A (MabSelect SuRe). El eluido de proteína A se sometió a continuación a cromatografía de intercambio catiónico (Poros 50 HS) y posteriormente se fraccionó y analizó mediante SE-HPLC y electroforesis capilar. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se sometieron a cromatografía de interacción hidrófoba (butil-Sepharose 4FF) a temperatura ambiente en un modo de unión-elución. El eluido del mismo se fraccionó a continuación y se analizó por medio de SE-HPLC y electroforesis capilar. 30 Las fracciones que contenían el producto se agruparon y posteriormente se realizó una cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF) en modo de flujo continuo. El material obtenido usando este procedimiento de purificación tenía un contenido de monómero >98 %.

Ejemplo 4

35 **Unión de TCB MCSP a células que expresan MCSP y CD3**

La unión de TCB MCSP se sometió a prueba en una línea celular de melanoma maligno humano que expresa MCSP (A375) y una línea de linfocitos T inmortalizados que expresa CD3 (Jurkat). En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2 x 10⁶ células/ml en tampón FACS (100 µl de PBS, BSA al 0,1 %). Se incubaron 100 µl de suspensión celular (que contenía 0,2 x 10⁶ células) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones crecientes de TCB MCSP (2,6 pM - 200 nM), se lavó dos veces con PBS, BSA al 0,1 % frío, se reincubó durante otros 30 min a 4 °C con anticuerpo secundario específico del fragmento Fcγ anti-IgG humana caprino fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con PE (Jackson Immuno Research Lab PE n.º 109-116-170), se lavó dos veces con PBS, BSA al 0,1 % frío y se analizó de inmediato por FACS usando un FACS Cantoll (programa informático FACS Diva) eliminando las células vivas negativas para DAPI. Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism5 (figura 7A, unión a células A375, CE₅₀ = 3381 pM; figura 7B, unión a células Jurkat).

50 **Ejemplo 5**

Destrucción mediada por linfocitos T inducida por anticuerpo TCB MCSP

55 La destrucción mediada por linfocitos T inducida por el anticuerpo TCB MCSP se evaluó usando un panel de líneas celulares tumorales que expresan diferentes niveles de MCSP (A375 = MCSP alto, MV-3 = MCSP medio, HCT-116 = MCSP bajo, LS180 = MCSP negativo). En resumen, se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se

lavaron y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche. Los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), se desechó el plasma por encima de la interfase que contenía los PBMC y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). La población de PBMC resultante se contó automáticamente (ViCell) y se almacenó en un medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) a 37 °C, CO₂ al 5 % en incubadora celular hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de destrucción, se añadió el anticuerpo a las concentraciones indicadas (intervalo de 1 pM - 10 nM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a una proporción efector:diana (E:T) final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células tumorales después de 24 h de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % por cuantificación de LDH liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin construcción biespecífica. Los resultados muestran que TCB MCSP indujo una destrucción fuerte y específica de la diana de las líneas de células diana que expresan MCSP sin destruir las líneas celulares que no expresan MCSP (figura 8, A-D). Los valores de CE₅₀ relacionados con los ensayos de destrucción, calculados usando GraphPadPrism5, se dan en la tabla 7.

Tabla 7. Valores de CE₅₀ (pM) para la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan MCSP inducida por el anticuerpo TCB MCSP

Línea celular	Número de copias del receptor de MCSP	CE ₅₀ [pM]
A375	387.058	12,3
MV-3	260.000	9,4
HCT-116	36770	3,7
LS180	Negativo	n.d.

Ejemplo 6

Regulación por incremento de CD25 y CD69 en células efectoras CD8⁺ y CD4⁺ después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan MCSP inducida por el anticuerpo TCB MCSP

La activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales MV-3 que expresan MCSP mediada por el anticuerpo TCB MCSP se evaluó mediante análisis FACS usando anticuerpos que reconocen los marcadores de activación de linfocitos T CD25 (marcador de activación tardía) y CD69 (marcador de activación temprana). El anticuerpo y las condiciones del ensayo de destrucción fueron esencialmente como se describe anteriormente (ejemplo 5), usando el mismo intervalo de concentraciones de anticuerpo (1 pM - 10 nM por triplicado), proporción E:T 10:1 y un tiempo de incubación de 24 h.

Después de la incubación, se transfirieron PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugaron a 350 x g durante 5 min y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1 %. Se realizó la tinción de superficie para CD8 (anti-CD8 humano FITC, BD n.º 555634), CD4 (anti-CD4 humano PECy7, BD n.º 557852), CD69 (anti-CD69 humano PE, Biolegend n.º 310906) y CD25 (anti-CD25 humano APC, BD n.º 555434) de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron durante 15 min a 4 °C, usando 100 µl/pocillo de tampón de fijación (BD n.º 554655). Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1 % que contenía DAPI para excluir las células muertas para la medición de FACS. Se analizaron las muestras en FACS Fortessa de BD. Los resultados muestran que TCB MCSP indujo una regulación por incremento fuerte y específica de diana de los marcadores de activación (CD25, CD69) en los linfocitos T CD8⁺ (figura 9A, B) y los linfocitos T CD4⁺ (figura 9C, D) después de la destrucción.

Ejemplo 7

Secreción de citocinas por células efectoras humanas después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan MCSP inducida por el anticuerpo TCB MCSP

La secreción de citocinas por los PBMC humanos después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales MV-3 que expresan MCSP inducida por el anticuerpo TCB MCSP se evaluó mediante análisis FACS de sobrenadantes celulares después del ensayo de destrucción.

Se usó el mismo anticuerpo y el ensayo de destrucción se realizó esencialmente como se describe anteriormente (ejemplos 5 y 6), usando una proporción E:T de 10:1 y un tiempo de incubación de 24 h.

Al final del tiempo de incubación, la placa se centrifugó durante 5 min a 350 x g, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. Se detectaron granzima B, TNF α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 secretadas en los sobrenadantes celulares usando el conjunto para Flex de CBA:proteína soluble humana de BD, de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un FACS Cantoll. Se usaron los siguientes kits: conjunto para Flex de CBA:granzima B humana (BD n.º 560304); conjunto para Flex de CBA:TNF humano (BD n.º 558273); conjunto para Flex de CBA:IFN- γ humano (BD n.º 558269); conjunto para Flex de CBA:IL-2 humana (BD n.º 558270); conjunto para Flex de CBA:IL-4 humana (BD n.º 558272); conjunto para Flex de CBA:IL-10 humana (BD n.º 558274).

Los resultados muestran que TCB MCSP indujo la secreción de IL-2, IFN- γ , TNF α , granzima B e IL-10 (pero no IL-4) tras la destrucción (figura 10, A-F).

Tomados conjuntamente, estos ejemplos muestran que el anticuerpo biespecífico CD3 MCSP:

- mostró una buena unión a las células A375 que expresan MCSP,
- indujo una destrucción fuerte y específica de diana de líneas de células diana que expresan MCSP, y ninguna destrucción de líneas celulares que no expresan MCSP,
- indujo una regulación por incremento fuerte y específica de diana de marcadores de activación (CD25, CD69) en linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ después de la destrucción,
- indujo secreción de IL-2, IFN- γ , TNF α , granzima B e IL-10 (no de IL-4) tras la destrucción.

Ejemplo 8

Unión de TCB CEA a células que expresan CEA y CD3

La unión de TCB CEA se sometió a prueba en células de adenocarcinoma de pulmón que expresan CEA transfectadas (A549-huCEA) y líneas de linfocitos T humanos y de macaco cangrejero inmortalizadas que expresan CD3 (Jurkat y HSC-F, respectivamente). Se usó como control una TCB no dirigida (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62; véase el ejemplo 24). En resumen, se recogieron las células, se contaron, se comprobó su viabilidad y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en tampón FACS (100 μ l de PBS, BSA al 0,1 %). Se incubaron 100 μ l de suspensión celular (que contenía $0,2 \times 10^6$ células) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 min a 4 °C con concentraciones crecientes de TCB CEA (61 pM - 1000 nM), se lavó dos veces con PBS, BSA al 0,1 % frío, se reincubó durante otros 30 min a 4 °C con anticuerpo secundario específico del fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana caprino fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con FITC (Jackson Immuno Research Lab FITC n.º 109-096-097), se lavó dos veces con PBS, BSA al 0,1 % frío y se analizó de inmediato por FACS usando un FACS Cantoll o Fortessa (programa informático FACS Diva) eliminando las células vivas negativas para PI. Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism5 (figura 11A, unión a células A549 (CE₅₀ = 6,6 nM); figura 11B, unión a células Jurkat; figura 11C, unión a células HSC-F).

Ejemplo 9

Destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales que expresan CEA inducida por el anticuerpo TCB CEA

La destrucción mediada por linfocitos T de las células diana inducida por el anticuerpo TCB CEA se evaluó en células tumorales humanas HPAFII (CEA alto), BxPC-3 (CEA medio) y ASPC-1 (CEA bajo). Se usaron HCT-116 (línea celular tumoral que no expresa CEA) y la TCB no dirigida como controles negativos. Se usaron PBMC humanos como células efectoras y se detectó la destrucción 24 h y 48 h después de la incubación con el anticuerpo biespecífico. En resumen, se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche. Los leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), se desechó el plasma por encima de la interfase que contenía los PBMC y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). Se contó automáticamente la población de PBMC resultante (ViCell) y se mantuvo en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) en incubadora celular (37 °C, CO₂ al 5 %) hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de destrucción, se añadieron los anticuerpos a las concentraciones indicadas (intervalo de 6 pM - 100 pM

por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a la proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células diana después de 24 h y 48 h de incubación por cuantificación de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin anticuerpo biespecífico. Los resultados muestran que TCB CEA indujo una destrucción fuerte y específica de diana de las células diana que expresan CEA (figura 12, A-H). Los valores de CE₅₀ relacionados con los ensayos de destrucción, calculados usando GraphPadPrism5, se dan en la tabla 8.

Tabla 8. Número de copias del receptor de CEA y valores de CE₅₀ (pM) para la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan CEA inducida por el anticuerpo TCB CEA

Línea celular	Número de copias del receptor de CEA	CE ₅₀ [pM] 48 h
HPAFII	120.000 - 205.000	667
BxPC-3	41.000	3785
ASPC1	3500 - 8000	846

Ejemplo 10

Proliferación y activación de linfocitos T 5 días después de la destrucción mediada por TCB CEA de células diana tumorales que expresan CEA

La proliferación y activación de linfocitos T se detectó 5 días después de la destrucción mediada por TCB CEA de células diana tumorales que expresan CEA evaluadas en células HPAFII (CEA alto), BxPC-3 (CEA medio) y ASPC-1 (CEA bajo). Se usaron HCT-116 (línea celular tumoral que no expresa CEA) y la TCB no dirigida como controles negativos. Las condiciones experimentales para el ensayo de proliferación fueron similares a las descritas en el ejemplo 9, pero solo se sembraron 10.000 células diana por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Para evaluar la proliferación de linfocitos T, se marcaron PBMC recién aislados usando CFSE (Sigma n.º 21888). En resumen, la solución madre de CFSE se diluyó para obtener una solución de trabajo de 100 µM. Se resuspendieron 90 x 10⁶ células PBMC en 90 ml de PBS precalentado y se complementaron con 90 µl de la solución de trabajo de CFSE. Las células se mezclaron de inmediato y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Se añadieron 10 ml de FCS precalentado a las células para detener la reacción. Las células se centrifugaron durante 10 min a 400 x g, se resuspendieron en 50 ml de medio y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavaron una vez con medio tibio, se contaron, se resuspendieron en medio y se añadieron a las células diana para el ensayo de destrucción y la medición posterior de la proliferación y activación celular a una proporción E:T de 10:1. La proliferación se evaluó 5 días después de la destrucción en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ mediante cuantificación de la dilución de tinte de CFSE. La expresión de CD25 se evaluó en los mismos subconjuntos de linfocitos T usando el anticuerpo anti-CD25 humano. En resumen, después de la centrifugación (400 x g durante 4 min), las células se resuspendieron, se lavaron con tampón FACS y se incubaron con 25 µl de la mezcla diluida de anticuerpos CD4/CD8/CD25 durante 30 min a 4 °C (APC / Cy7 anti-CD4 humano n.º 317418, APC anti-CD8 humano n.º 301014, PE / Cy7 anti-CD25 humano n.º 302612). A continuación, las células se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido, y finalmente se resuspendieron en 200 µl de tampón FACS que contenía yoduro de propidio (PI) para excluir las células muertas para la medición de FACS. La fluorescencia se midió usando FACS Cantoll de BD. Los resultados muestran que TCB CEA indujo una proliferación fuerte y específica de diana de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ (figura 13, A-D), así como su activación detectada por regulación por incremento del marcador de activación CD25 (figura 13, E-H).

Ejemplo 11

Secreción de citocinas por células efectoras humanas después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan CEA inducida por TCB CEA

La secreción de citocinas por PBMC humanos después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales MKN45 que expresan CEA inducida por TCB CEA se evaluó mediante análisis FACS (kit CBA) de sobrenadantes celulares 48 h después de la destrucción celular.

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en el ejemplo 9. Al final del tiempo de incubación, la placa se centrifugó durante 5 min a 350 x g, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. Se detectaron (A) IFN-γ, (B) TNFα, (C) granzima B, (D) IL-2, (E) IL-6 y (F) IL-10 secretadas en los sobrenadantes celulares usando el conjunto para Flex de CBA:proteína soluble humana de BD, de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un FACS Cantoll. Se usaron los siguientes kits: conjunto para Flex de CBA:IL-2 humana (BD n.º 558270); conjunto para Flex de CBA:granzima B humana (BD n.º 560304); conjunto para Flex de CBA:TNF humano (BD n.º 558273); conjunto para Flex de CBA:IFN-γ humano (BD n.º 558269); conjunto para Flex de CBA:IL-4 humana (BD n.º 558272); conjunto para Flex de CBA:IL-10 humana (BD n.º 558274).

Los resultados muestran que la destrucción mediada por TCB CEA (pero no la destrucción mediada por TCB no dirigida de control) indujo la secreción de IFN- γ , TNF α , granzima B, IL-2, IL-6 e IL-10 (figura 14, A-F).

Ejemplo 12

5 **Destrucción mediada por linfocitos T de células diana en presencia de concentraciones crecientes de CEA de desprendimiento (sCEA)**

Se evaluó la destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales que expresan CEA (LS180) inducida por el anticuerpo TCB CEA en presencia de concentraciones crecientes de CEA de desprendimiento (sCEA 2,5 ng/ml - 5 μ g/ml). Se usaron PBMC humanos como células efectoras y se detectó la destrucción 24 h y 48 h después de la incubación con el anticuerpo biespecífico y sCEA. En resumen, se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche. Los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), se desechó el plasma por encima de la interfase que contenía los PBMC y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). Se contó automáticamente la población de PBMC resultante (ViCell) y se mantuvo en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) en incubadora celular (37 °C, CO₂ al 5 %) hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de destrucción, se usó el anticuerpo TCB CEA a una concentración fija de 1 nM y se añadió sCEA al experimento en un intervalo de concentración de 2,5 ng - 5 μ g/ml. Se añadieron PBMC a células diana a la proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células diana después de 24 h y 48 h de incubación por cuantificación de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin anticuerpo biespecífico. La destrucción mediada por TCB CEA en ausencia de sCEA se estableció en 100 % y la destrucción obtenida en presencia de concentraciones crecientes de sCEA se normalizó a este valor. Los resultados muestran que sCEA tuvo solo un impacto menor en la destrucción mediada por TCB CEA de células diana que expresan CEA (figura 15A, B). No se detectó ningún efecto sobre la destrucción mediada por linfocitos T hasta 0,2 μ g/ml de sCEA. Las concentraciones de sCEA superiores a 0,2 μ g/ml tuvieron solo un impacto menor en la destrucción global (reducción del 10-50 %).

Ejemplo 13

40 **Destrucción mediada por linfocitos T de células diana usando PBMC humanos y de macaco cangrejero como células efectoras**

La destrucción mediada por linfocitos T de células A549 (adenocarcinoma de pulmón) que sobreexpresan CEA humano (A549-hCEA) se evaluó 21 h y 40 h después de la incubación con anticuerpo TCB CEA y PBMC humanos o PBMC de macaco cangrejero como células efectoras. En resumen, se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante varias horas. Se prepararon leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación por densidad en Histopaque de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos o macacos cangrejeros sanos. Para los últimos, se usó un gradiente de densidad de Histopaque-PBS al 90 %. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente para PBMC humanos; respectivamente 520 x g, 30 min, temperatura ambiente para PBMC de macaco cangrejero), se desechó el plasma por encima de la interfase que contenía PBMC y se transfirieron los PBMC en un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). Para la preparación de los PBMC de macaco cangrejero, se realizó una etapa de centrifugación adicional a baja velocidad a 150 x g durante 15 min. Se contó automáticamente la población de PBMC resultante (ViCell) y se mantuvo en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) en incubadora celular (37 °C, CO₂ al 5 %) hasta su uso posterior (hasta 4 h). Para el ensayo de destrucción, se añadieron los anticuerpos a las concentraciones indicadas (intervalo de 6 pM - 100 pM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a la proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células diana después de 21 h y 40 h de incubación por cuantificación de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin anticuerpo biespecífico. Los resultados

muestran que TCB CEA media en la destrucción específica de diana de células diana que expresan CEA usando células efectoras (PBMC) humanas (figura 16A, C) y de macaco cangrejero (figura 16B, D). Los valores de CE_{50} relacionados con 40 h de destrucción, calculados usando GraphPadPrism5, son de 306 pM para PBMC humanos y de 102 pM para PBMC de macaco cangrejero.

Ejemplo 14

Destrucción mediada por linfocitos T de líneas celulares de cáncer colorrectal humano que expresan CEA inducida por el anticuerpo TCB CEA

Se evaluó la destrucción mediada por linfocitos T de líneas celulares de cáncer colorrectal humano que expresan CEA 48 h después de la incubación con PBMC humanos y anticuerpo TCB CEA a 0,8 nM, 4 nM y 20 nM. En resumen, se aislaron PBMC de filtros de leucocitos obtenidos de donantes sanos individuales. Las células se diluyeron con PBS (1:10) y se colocaron en capas sobre Lymphoprep en tubos Falcon de 50 ml. Después de la centrifugación (1800 rpm durante 25 min), la capa de PBMC se retiró de la interfase y se lavó 4 veces con PBS. Se contaron los PBMC, se congelaron en DMSO al 10 % en FCS en condiciones de congelación a velocidad controlada a 40×10^6 células/ml y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso posterior. Para el ensayo de destrucción mediada por linfocitos T, las células tumorales se sembraron directamente en placas de 96 pocillos de reservas congeladas. Las células se calentaron rápidamente y se transfirieron de inmediato a un medio precalentado, se centrifugaron y se resuspendieron en medio completo (DMEM, Iscoves o RPMI-1640, todos complementados con FCS al 10 % y penicilina/estreptomina al 1 %) y se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo. Las placas se incubaron a continuación a 37 °C en una incubadora humidificada con 10 % de CO_2 y el medio se reemplazó al día siguiente por 100 µl de RPMI con FCS al 2 % con glutamina al 1 % y 50 µl de TCB CEA (concentraciones finales en el intervalo desde 6,4 hasta 20.000 pM, etapas de valoración 1:5, en pocillos duplicados para cada condición). Se usaron PBMC recién descongelados para el ensayo (descongelados de viales congelados dentro de las 2 horas posteriores al inicio del ensayo) y se añadieron 50 µl (3×10^5 células) a cada pocillo para dar una proporción efector:diana (E:T) de 10:1. Se añadió Triton X100 (50 µl de 4 %) a 150 µl de células diana para obtener valores máximos de liberación. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y se determinó la actividad de destrucción usando el kit de detección de citotoxicidad de lactosa deshidrogenasa (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de lisis celular específica se calculó como $[\text{liberación de muestra} - \text{liberación espontánea}] / [\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}] \times 100$. La figura 17A-C muestra la correlación entre la expresión de CEA (número de copias del receptor cuantificado usando QIFIKIT, véase a continuación) y el % de destrucción para 31 líneas celulares de cáncer colorrectal (enumeradas en el eje de abscisas). La figura 17D muestra la correlación entre la expresión de CEA y el % de lisis específica a 20 nM de TCB CEA (correlación de Spearman = 0,7289, $p < 0,0001$, $n = 31$), lo que indica que TCB CEA lisa eficazmente las células tumorales que muestran números altos de copias del receptor de CEA (>50.000), mientras que TCB CEA no lisa una agrupación de células que muestran números bajos de copias de receptor de CEA (<10.000) en las mismas condiciones experimentales. La figura 17E muestra la correlación entre la expresión de CEA y la CE_{50} de TCB CEA. Aunque la correlación no es estadísticamente significativa (correlación de Spearman = -0,3994, $p = 0,1006$, $R^2 = 0,1358$), el gráfico muestra claramente un patrón de mejor potencia de TCB CEA (es decir, valores CE_{50} más bajos) en líneas de células tumorales que expresan números altos de copias del receptor de CEA.

Para el análisis de la expresión superficial de CEA en líneas celulares de cáncer se usó Qifikit (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) para calibrar las señales fluorescentes y determinar el número de sitios de unión por célula. Las células se incubaron en hielo durante 30 min con un anticuerpo monoclonal anti-CEACAM5 humano de ratón (0,5 µg para 5×10^5 células, clon: CI-P83-1, sc-23928, Santa Cruz), se lavaron dos veces con PBS1X-BSA al 0,1 % seguido de una incubación de 45 min con anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína proporcionado con Qifikit. Las células muertas se excluyeron del análisis usando tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las muestras se analizaron en un analizador CyAn™ ADP (Beckman Coulter). Todas las intensidades medias de fluorescencia (MFI) se obtuvieron después del análisis de datos usando el programa informático Summit 4.3. Estas MFI se usaron para determinar el número relativo de sitios de unión de anticuerpos en las líneas celulares (nombrado como número de copias de CEA en los resultados) usando la ecuación obtenida de la curva de calibración (microesferas de calibración Qifikit).

Las líneas celulares de cáncer colorrectal usadas para los ensayos de destrucción mediada por linfocitos T y la cuantificación de la expresión de superficie de CEA se sembraron a partir de crioviales. El procedimiento usado para mantener las reservas congeladas fue como se describe en Bracht *et al.* (Bracht *et al.* (2010), Br J Cancer 103, 340-346).

Ejemplo 15

Eficacia antitumoral *in vivo* de TCB CEA en un carcinoma de colon humano LS174T-fluc2 coinjetado con PBMC humanos (proporción E:T 5:1)

Los ratones NOG (NOD/Shi-scid/IL-2R γ null) ($n = 12$) recibieron una inyección por vía subcutánea con 1×10^6 células LS174T-fluc2 premezcladas con PBMC humanos en un volumen total de 100 µl en PBS, proporción

E:T 5:1. Las células LS174T-fluc2 se han genomanipulado para que expresen luciferasa, lo que permite monitorizar la progresión tumoral por bioluminiscencia (BLI) de una manera no invasiva y altamente sensible. Para evaluar los efectos del tratamiento temprano y tardío, los ratones recibieron inyecciones i.v. quincenales de 0,5 o 2,5 mg/kg de TCB CEA a partir del día 1 (tratamiento temprano) o del día 7 (tratamiento tardío) después de coinjertar células tumorales y PBMC de forma subcutánea. Como control, un grupo de ratones recibió inyecciones i.v. quincenales de 2,5 mg/kg de una TCB de control que tenía el mismo formato que TCB CEA (en este caso, la TCB MCSP sirvió como control no dirigido ya que las células LS174T-fluc2 no expresan MCSP), y un grupo de control adicional recibió solo PBS (vehículo) a partir del día 1. El volumen tumoral se midió una vez por semana con un calibrador digital. Además, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal una vez por semana con D-luciferina y la emisión de luz bioluminiscente de las células tumorales vivas se midió con IVIS Spectrum (Perkin Elmer). El tratamiento se administró hasta 19 días después de la inoculación de células tumorales, que corresponde al día de finalización del estudio. Los resultados del experimento se muestran en la figura 18A-D. Los resultados muestran el promedio y SEM de 12 ratones con volumen tumoral medido con un calibrador (A y C) y por bioluminiscencia (flujo total, B y D) en los diferentes grupos de estudio ((A, B) tratamiento temprano, (C, D) tratamiento tardío).

Ejemplo 16

Eficacia antitumoral *in vivo* de TCB CEA en un carcinoma de colon humano LS174T-fluc2 coinjertado con PBMC humanos (proporción E:T 1:1)

Los ratones NOG (NOD/Shi-scid/IL-2R γ null) (n = 10) recibieron una inyección por vía subcutánea con 1×10^6 células LS174T-fluc2 (véase el ejemplo 15) premezcladas con PBMC humanos en un volumen total de 100 μ l en PBS, proporción E:T 1:1. Para evaluar los efectos del tratamiento temprano y tardío, los ratones recibieron inyecciones i.v. quincenales de 2,5 mg/kg de TCB CEA a partir del día 1 (tratamiento temprano) o del día 7 (tratamiento tardío) después la inoculación de células tumorales. Como control, un grupo de ratones recibió inyecciones i.v. quincenales de 2,5 mg/kg de TCB MCSP (véase también el ejemplo 15) y un grupo de control adicional recibió solo PBS (vehículo) a partir del día 1. El volumen tumoral se midió una vez por semana con un calibrador digital. Además, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal una vez por semana con D-luciferina y la emisión de luz bioluminiscente de las células tumorales vivas se midió con IVIS Spectrum (Perkin Elmer). El tratamiento se administró hasta 23 días después de la inoculación de células tumorales, que corresponde al día de finalización del estudio. Los resultados del experimento se muestran en la figura 19. Los resultados muestran el promedio y SEM del volumen tumoral medido con un calibrador (A), así como por la bioluminiscencia (B) en los diferentes grupos de estudio (n = 10).

Ejemplo 17

Eficacia *in vivo* de TCB CEA murinizadas en un modelo de tumor ortotópico Panco2-huCEA en ratones transgénicos huCD3 ϵ /huCEA inmunocompetentes

Los ratones transgénicos huCD3 ϵ /huCEA (n = 10) recibieron una inyección intrapancreática de 2×10^5 células Panco2-huCEA en un volumen total de 10 μ l en PBS. Como las células murinas no expresan CEA, la línea celular de carcinoma pancreático murino Panco2 se genomanipuló para que sobreexpresara CEA humano como el antígeno diana para la TCB CEA. Los ratones recibieron una inyección i.v. dos veces por semana con 0,5 mg/kg del TCB CEA murinizado o PBS como grupo de control (vehículo) y se monitorizó la supervivencia. Se controló a los animales diariamente para determinar síntomas clínicos y detección de efectos adversos. Los criterios de eliminación para los animales fueron dolencias visibles: pelaje desaliñado, espalda arqueada, problemas respiratorios, locomoción deteriorada. El resultado de supervivencia global se muestra en la figura 20. El resultado muestra el porcentaje de animales supervivientes por punto temporal. La significación del grupo de tratamiento se comparó con el grupo de control de PBS mediante una prueba de la t de Student para datos emparejados (p = 0,078).

Ejemplo 18

Afinidad de TCB CEA por CEA y CD3 por resonancia de plasmón superficial (SPR)

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron en un Biacore T100 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo / Alemania).

Para las mediciones de afinidad, se capturó TCB CEA en la superficie de un chip sensor CM5 con anti-Fab humano inmovilizado (GE Healthcare n.º 28-9583-25). La IgG de captura se acopló a la superficie del chip sensor por inmovilización directa de alrededor de 10.000 unidades de resonancia (UR) a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Friburgo / Alemania).

Para analizar la interacción con CD3 ϵ -tallo-Fc(botón)-Avi/CD3 δ -tallo-Fc(ojal) humano (SEQ ID NO: 120 y 121, respectivamente), se capturó TCB CEA durante 30 s a 50 nM con 10 μ l/min. Las CD3 ϵ /CD3 δ se pasaron a una concentración de 0,68-500 nM con un caudal de 30 μ l/min a través de las cubetas de lectura durante 360 s. Se monitorizó la disociación durante 360 s.

El valor de K_D de la interacción entre TCB CEA y el antígeno diana tumoral recombinante NABA-avi-his humano (que contiene el dominio B3 del CEA humano (CEACAM5) rodeado por el dominio N, A1 y A2 del CEACAM1 humano con una marca C terminal avi-6his; véase SEQ ID NO: 119) se determinó capturando la molécula TCB durante 40 s a 10 μ l/min. El antígeno se pasó sobre la cubeta de lectura durante 240 s a un intervalo de concentración de 0,68 a 500 nM con un caudal de 30 μ l/min. La disociación se midió durante 240 s.

Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia. Aquí, los antígenos se pasaron sobre una superficie con anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado, pero en el que se había inyectado HBS-EP en lugar de CEA.

Las constantes cinéticas se derivaron usando el programa informático de evaluación Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala / Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica. La semivida ($t_{1/2}$) de la interacción se calculó usando la siguiente fórmula: $t_{1/2} = \ln 2 / k_{dis}$.

La TCB CEA se une a la diana tumoral y CD3 ϵ /CD3 δ en el intervalo nM con valores de K_D de 62 nM para NABA humano y de 75,3 nM para CD3 ϵ /CD3 δ humano. La semivida de la unión monovalente a NABA es de 5,3 minutos, la semivida de la unión a CD3 ϵ /CD3 δ es de 5,7 minutos. Los valores cinéticos se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Afinidad de TCB CEA por NABA humano y CD3 ϵ /CD3 δ humano (T = 25 °C)

Antígeno	TCB	k_{as} [1/Ms]	k_{dis} [1/s]	$t_{1/2}$ [min]	K_D [nM]
NABA humano	TCB CEA	$3,49 \times 10^4$	$2,18 \times 10^{-3}$	5,3	62,4
CD3 ϵ /CD3 δ humano	TCB CEA	$2,69 \times 10^4$	$2,03 \times 10^{-3}$	5,7	75,3

Ejemplo 19

Afinidad de TCB MCSP por MCSP y CD3 por resonancia de plasmón superficial (SPR)

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron en un Biacore T100 a 25 °C con HBS-EP como tampón de migración (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, Biacore, Friburgo / Alemania).

Para las mediciones de afinidad, se capturó TCB MCSP en la superficie de un chip sensor CM5 con anti-Fab humano inmovilizado (GE Healthcare n.º 28-9583-25). La IgG de captura se acopló a la superficie del chip sensor por inmovilización directa de alrededor de 7.500 unidades de resonancia (UR) a pH 5,0 usando el kit de acoplamiento de amina estándar (Biacore, Friburgo / Alemania). Las TCB MCSP se capturaron durante 60 s a 30 nM con 10 μ l/min. Se pasaron MCSP D3 humano y de macaco cangrejero (véase SEQ ID NO: 118 y 117, respectivamente) a una concentración de 0,024-50 nM con un caudal de 30 μ l/min a través de las cubetas de lectura durante 90 s. El intervalo de concentración para el CD3 ϵ -tallo-Fc(botón)-Avi/CD3 δ -tallo-Fc(ojal) humano y de macaco cangrejero fue de 1,17-600 nM. Dado que se esperaba que la interacción con MCSP D3 murino (SEQ ID NO: 122) fuera débil, el intervalo de concentración para este antígeno se eligió entre 3,9 y 500 nM. La disociación para todas las interacciones se monitorizó durante 120 s. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida en una cubeta de lectura de referencia. Aquí, los antígenos se pasaron sobre una superficie con anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado, pero en el que se había inyectado HBS-EP en lugar de TCB MCSP.

Las constantes cinéticas se derivaron usando el programa informático de evaluación Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala / Suecia), para ajustar las ecuaciones de velocidad para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica. La interacción para TCB MCSP con MCSP D3 murino se determinó en situación de equilibrio. La semivida ($t_{1/2}$) de la interacción se calculó usando la siguiente fórmula: $t_{1/2} = \ln 2 / k_{dis}$.

La TCB MCSP se une a la diana tumoral en el intervalo pM con valores de K_D de 0,15 nM para el antígeno humano y de 0,12 nM para el antígeno de macaco cangrejero. El CD3 ϵ /CD3 δ recombinante está unido por TCB MCSP con un valor de K_D de 78 nM (humano) y 104 nM (macaco cangrejero). La semivida de la unión monovalente es de hasta 260 minutos para la diana tumoral y de 2,9 minutos para CD3 ϵ /CD3 δ . Tras la maduración por afinidad, el anticuerpo MCSP obtuvo cierta unión a MCSP D3 murino recombinante. El valor de K_D para esta interacción está en el intervalo mM (1,6 mM). Los valores cinéticos se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Afinidad de TCB MCSP por MCSP D3 humano, de macaco cangrejero y murino y CD3ε/CD3δ humano y de macaco cangrejero (T = 25 °C).

	k_{as} [1/Ms]	k_{dis} [1/s]	t_{1/2} [min]	K_D [nM]
MCSP D3 humano	3,89 x 10 ⁵	5,63 x 10 ⁻⁵	205	0,15
MCSP D3 de macaco	3,70 x 10 ⁵	4,39 x 10 ⁻⁵	263	0,12
MCSP D3 murino	nd	nd	nd	1570*
CD3ε/CD3δ humano	4,99 x 10 ⁴	3,92 x 10 ⁻³	2,9	78,7
CD3ε/CD3δ de macaco	4,61 x 10 ⁴	4,78 x 10 ⁻³	2,4	104

* determinado por medición en situación de equilibrio

5 Ejemplo 20

Estabilidad térmica de TCB CEA

10 La estabilidad térmica de TCB CEA se monitorizó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Se aplicaron por duplicado 30 µg de muestra de proteína filtrada con una concentración de proteínas de 0,5 mg/ml a un lector de placas Dynapro (Wyatt Technology Corporation; EE. UU.). La temperatura se elevó de 25 a 75 °C a 0,05 °C/min, obteniéndose el radio y la intensidad de dispersión total.

15 El resultado se muestra en la figura 21. La temperatura de agregación de TCB CEA se midió a 55 °C.

15 Ejemplo 21

Estabilidad térmica de TCB MCSP

20 La estabilidad térmica de TCB MCSP se monitorizó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Se aplicaron por duplicado 30 µg de muestra de proteína filtrada con una concentración de proteínas de 0,5 mg/ml a un lector de placas Dynapro (Wyatt Technology Corporation; EE. UU.). La temperatura se elevó de 25 a 75 °C a 0,05 °C/min, obteniéndose el radio y la intensidad de dispersión total.

25 El resultado se muestra en la figura 22. La temperatura de agregación de TCB MCSP se midió a 55 °C.

Ejemplo 22

30 Destrucción mediada por linfocitos T de células diana tumorales que expresan MCSP inducida por anticuerpos TCB MCSP y MCSP 1+1 CrossMab

La destrucción mediada por linfocitos T de células diana inducida por anticuerpos TCB MCSP y TCB MCSP 1+1 CrossMab (un anticuerpo biespecífico activador de linfocitos T que tiene las mismas secuencias de unión a CD3 y MCSP que TCB MCSP, con el formato molecular que se muestra en la figura 1D) se evaluó en células diana tumorales A375 (MCSP alto), MV-3 (MCSP medio) y HCT-116 (MCSP bajo). Se usó LS180 (línea celular tumoral negativa para MCSP) como control negativo. La destrucción de las células tumorales se evaluó 24 h y 48 h después de la incubación de las células diana con los anticuerpos y las células efectoras (PBMC humanos). En resumen, se recogieron células diana con tripsina/EDTA, se lavaron y se sembraron a una densidad de 25.000 células/pocillo usando placas de 96 pocillos de fondo plano. Se dejó que las células se adhirieran durante la noche. Los leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación por densidad en Histopaque a partir de preparaciones enriquecidas de linfocitos (capas leucocíticas) obtenidas de donantes humanos sanos. Se diluyó la sangre recién obtenida con PBS estéril y se colocó en una capa sobre un gradiente de Histopaque (Sigma, n.º H8889). Después de la centrifugación (450 x g, 30 minutos, temperatura ambiente), se desechó el plasma por encima de la interfase que contenía los PBMC y se transfirieron los PBMC a un nuevo tubo Falcon llenado posteriormente con 50 ml de PBS. Se centrifugó la mezcla (400 x g, 10 minutos, temperatura ambiente), se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de PBMC dos veces con PBS estéril (etapas de centrifugación 350 x g, 10 minutos). Se contó automáticamente la población de PBMC resultante (ViCell) y se mantuvo en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10 % y L-alanil-L-glutamina al 1 % (Biochrom, K0302) en incubadora celular (37 °C, CO₂ al 5 %) hasta su uso posterior (no más de 24 h). Para el ensayo de destrucción, se añadieron los anticuerpos a las concentraciones indicadas (intervalo de 0,01 pM - 10 nM por triplicado). Se añadieron PBMC a células diana a la proporción E:T final de 10:1. Se evaluó la destrucción de células diana después de 24 h y 48 h de incubación por cuantificación de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada en sobrenadantes celulares por células apoptóticas/necróticas (kit de detección de LDH, Roche Applied Science, n.º 11 644 793 001). Se logró la lisis máxima de las células diana (= 100 %) por incubación de células diana con Triton X-100 al 1 %. Lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras sin anticuerpo biespecífico. Los resultados muestran que el anticuerpo TCB MCSP es más potente que el anticuerpo MCSP 1+1 CrossMab TCB, ya que indujo una destrucción más fuerte de las células diana que expresan MCSP en ambos

puntos temporales y en todas las células diana tumorales (figura 23A-H). Los valores de CE₅₀ relacionados con los ensayos de destrucción, calculados usando GraphPadPrism5, se dan en la tabla 11.

5 **Tabla 11. Número de copias del receptor de MCSP y valores de CE₅₀ (pM) para la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan MCSP inducida por el anticuerpo TCB MCSP (n.d. = no determinado)**

Línea celular	Número de copias del receptor de MCSP	CE ₅₀ [pM] 24 h	CE ₅₀ [pM] 48 h
A375	387.058	0,1	n.d.
MV-3	260.000	1,0	0,7
HCT-116	36770	~ 6,2e-008	~ 0,09
LS180	negativo	~ 764	n.d.

10 Ejemplo 23

Regulación por incremento de CD25 y CD69 en células efectoras CD8⁺ y CD4⁺ después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan MCSP inducida por anticuerpos TCB MCSP y MCSP 1+1 CrossMab

15 La activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ después de la destrucción mediada por linfocitos T de células tumorales que expresan MCSP (A375 y MV-3) mediada por los anticuerpos TCB MCSP y MCSP 1+1 CrossMab se evaluó mediante análisis FACS usando anticuerpos que reconocen los marcadores de activación de linfocitos T CD25 (marcador de activación tardía) y CD69 (marcador de activación temprana). El anticuerpo y las condiciones del ensayo de destrucción fueron esencialmente como se describe anteriormente (ejemplo 22), usando el mismo intervalo de concentraciones de anticuerpo (0,01 pM - 10 nM por triplicado), proporción E:T 10:1 y un tiempo de incubación de 48 h.

25 Después de la incubación, se transfirieron PBMC a una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se centrifugaron a 350 x g durante 5 min y se lavaron dos veces con PBS que contenía BSA al 0,1 %. Se realizó la tinción de superficie para CD8 (anti-CD8 humano FITC, BD n.º 555634), CD4 (anti-CD4 humano PECy7, BD n.º 557852), CD69 (anti-CD69 humano PE, Biolegend n.º 310906) y CD25 (anti-CD25 humano APC, BD n.º 555434) de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Las células se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 0,1 % y se fijaron durante 15 min a 4 °C, usando 100 µl/pocillo de tampón de fijación (BD n.º 554655). Después de la centrifugación, las muestras se resuspendieron en 200 µl/pocillo de PBS con BSA al 0,1 % que contenía DAPI para excluir las células muertas para la medición de FACS. Se analizaron las muestras en FACS Fortessa de BD. Los resultados muestran que TCB MCSP indujo una regulación por incremento fuerte y específica de diana de los marcadores de activación (CD25, CD69) en linfocitos T CD8⁺ (figura 24A, B (para células A375) y E, F (para células MV-3)) y linfocitos T CD4⁺ (figura 24C, D (para células A375) y G, H (para células MV-3)) después de la destrucción. En cuanto a los resultados de destrucción, la activación de linfocitos T fue más fuerte con TCB MCSP que con MCSP 1+1 CrossMab.

35 Ejemplo 24

Preparación de TCB DP47 GS (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida = "TCB no dirigida") que contiene DP47 GS como anticuerpo de no unión y CH2527 humanizado como anticuerpo anti-CD3

40 La "TCB no dirigida" se usó como control en los experimentos anteriores. El anticuerpo biespecífico capta a CD3ε pero no se une a ningún otro antígeno y, por lo tanto, no puede reticular los linfocitos T con ninguna célula diana (y posteriormente no puede inducir ninguna destrucción). Por lo tanto, se usó como control negativo en los ensayos para monitorizar cualquier activación inespecífica de linfocitos T.

45 Se subclonaron las secuencias de ADN de la región variable de la cadena pesada y ligera sin cambio del marco de lectura con la cadena pesada constante o bien la cadena ligera constante preinsertada en el respectivo vector de expresión de mamífero receptor. La expresión del anticuerpo está dirigida por un promotor MPSV y lleva una secuencia señal poliA sintética en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contiene una secuencia OriP de EBV.

50 Se produjo la molécula cotransfectando células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de mamífero usando polietilenimina (PEI). Se transfectaron las células con los correspondientes vectores de expresión en una proporción 1:2:1:1 ("vector de cadena pesada Fc(ojal)": "vector de cadena ligera": "vector de cadena ligera Crossfab": "vector de cadena pesada Fc(botón)-FabCrossfab").

55 Para la transfección, se cultivaron células HEK293 EBNA en suspensión en medio de cultivo CD CHO libre de suero. Para la producción en un matraz de agitación de 500 ml, se sembraron 400 millones de células HEK293 EBNA 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se centrifugaron durante 5 min a 210 x g

60

y el sobrenadante se reemplazó por 20 ml de medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en 20 ml de medio CD CHO hasta una cantidad final de 200 µg de ADN. Después de la adición de 540 µl de solución PEI, la mezcla se sometió a agitación vorticial durante 15 s y posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con la solución de ADN/PEI, se transfirieron a matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera de 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación, se añadieron 160 ml de medio F17 y las células se cultivaron durante 24 horas. Un día después de la transfección, se añadió ácido valproico 1 mM y Feed 1 al 7 % (Lonza). Después de un cultivo de 7 días, se recogió el sobrenadante para la purificación mediante centrifugación durante 15 min a 210 x g, la solución se filtró en condiciones estériles (filtro de 0,22 µm) y se añadió acida de sodio hasta una concentración final de 0,01 % (p/v) y se mantuvo en 4 °C.

La proteína secretada se purificó de los sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. El sobrenadante se cargó en una columna HiTrap Protein A HP (VC = 5 ml, GE Healthcare) equilibrada con 40 ml de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. Se retiró la proteína no unida lavando con al menos 10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5. La proteína diana se eluyó usando un gradiente en 20 volúmenes de columna desde citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,5 hasta citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 2,5. Se neutralizó la solución de proteína añadiendo 1/10 de fosfato de sodio 0,5 M, pH 8. Se concentró la proteína diana y se filtró antes de su carga en una columna HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con histidina 20 mM, solución de cloruro de sodio 140 mM a pH 6,0.

Se determinó la concentración de proteína de las muestras de proteínas purificadas midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de aminoácidos.

Se analizaron la pureza y el peso molecular de las moléculas por análisis CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor. Se usó el sistema Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µg de muestra para los análisis.

Se analizó el contenido en agregado de las muestras de anticuerpo usando una columna analítica de exclusión por tamaño TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) en K₂HPO₄ 25 mM, NaCl 125 mM, monoclóhidrato de L-arginina 200 mM, NaN₃ al 0,02 % (p/v), tampón de migración a pH 6,7 a 25 °C.

Tabla 12. Resumen de producción y purificación de TCB DP47 GS

Construcción	Valor [mg/l]	Rendimiento [mg/l]	Agregado después de 1. ^a etapa de purificación [%]	HMW [%]	LMW [%]	Monómero [%]
TCB DP47 GS	103,7	8,04	8	2,3	6,9	91,8

La figura 25 y la tabla 13 muestran análisis CE-SDS de TCB DP47 GS (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA invertida) que contiene DP47 GS como anticuerpo de no unión y CH2527 humanizado como anticuerpo anti-CD3 (SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62).

Tabla 13. Análisis CE-SDS de TCB DP47 GS

	Pico	kDa	Cadena correspondiente
TCB DP47 GS no reducida (A)	1	165,22	Molécula con 2 cadenas ligeras faltantes
	2	181,35	Molécula con 1 cadena ligera faltante
	3	190,58	Molécula correcta sin glucosilación unidad a N
	4	198,98	Molécula correcta
TCB DP47 GS reducida (B)	1	27,86	DP47 GS de cadena ligera
	2	35,74	huCH2527 de cadena ligera
	3	63,57	Fc(ojal)
	4	93,02	Fc(botón)

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Roche Glycart AG
- <120> Moléculas de unión a antígeno activadoras de linfocitos T biespecíficas
- <130> 31447
- 5 <150> EP 13156686.1
- <151> 26/02/2013
- <160> 122
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 10 <211> 455
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> HC CD3 CH2527 (VH_3-23(12))
- 15 <400> 1

```

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50           55           60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65           70           75           80

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

ES 2 775 207 T3

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160'
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

ES 2 775 207 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 2

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 2

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

10

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

ES 2 775 207 T3

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 3

<211> 125

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 3

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

10

ES 2 775 207 T3

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 4

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

10 <210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 6

ES 2 775 207 T3

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 7

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

10

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 8

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

20 <210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

<220>

<223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 9

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

5 <210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 10

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 11

<211> 442

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC MCSP M4-3 (C1)\$

<400> 11

ES 2 775 207 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

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

ES 2 775 207 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC MCSP ML2 (G3)

<400> 12

ES 2 775 207 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 13

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH MCSP M4-3 (C1)

<400> 13

ES 2 775 207 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR1 MCSP M4-3 (C1)

<400> 14

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

10 <210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (C1)

<400> 15

Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 16

<211> 3

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

<220>

<223> HCDR3 MCSP M4-3 (C1)

<400> 16

Phe Asp Tyr
1

5 <210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VL MCSP ML2 (G3)

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 18

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 MCSP ML2 (G3)

<400> 18

20 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> LCDR2 MCSP ML2 (G3)

<400> 19

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

10 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LCDR3 MCSP ML2 (G3)

15 <400> 20

Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp Thr
 1 5

20 <210> 21
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> HC CEA CH1A1A 98-99

<400> 21

ES 2 775 207 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

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

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

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

ES 2 775 207 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 22

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC CEA 2F1

<400> 22

ES 2 775 207 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 23

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH CEA CH1A1A 98-99

10 <400> 23

ES 2 775 207 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR1 CEA CH1A1A 98-99

10 <400> 24

Glu Phe Gly Met Asn
 1 5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99

<400> 25

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

ES 2 775 207 T3

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99
 <400> 26

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 27
 10 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VL CEA 2F1

15 <400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 CEA 2F1

<400> 28

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
 1 5 10

<210> 29

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 CEA 2F1

10 <400> 29

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
 1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 CEA 2F1

<400> 30

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
 1 5 10

20 <210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> VL CD3 CH2527 (VL_7-43(11))

<400> 31

ES 2 775 207 T3

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser
100 105 110

<210> 32

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93A)

<400> 32

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

10

ES 2 775 207 T3

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 33

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93AR94K)

<400> 33

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

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

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

10

Tyr Cys Ala Lys His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH MCSP M4-3 (D6)

ES 2 775 207 T3

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Lys Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 35

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR2 MCSP M4-3 (D6)

<400> 35

10 Ile Thr Phe Asp Gly Lys Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> VH MCSP M4-3 (A7)

<400> 36

ES 2 775 207 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asp Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR1 MCSP M4-3 (A7)

<400> 37

Asp Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

10 <210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (A7)

<400> 38

Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 39

<211> 112

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

<220>

<223> VH MCSP M4-3 (B7)

<400> 39

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

5 <210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (B7)

<400> 40

Ile Thr Phe Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 41

<211> 112

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH MCSP M4-3 (B8)

<400> 41

20 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

ES 2 775 207 T3

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> VL MCSP ML2 (E10)

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 44

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 MCSP ML2 (E10)

<400> 44

Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr Leu Asn
 1 5 10

15

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> LCDR3 MCSP ML2 (E10)

ES 2 775 207 T3

<400> 45

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 46

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL MCSP ML2 (E10-G3)

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> VL MCSP ML2 (C5)

<400> 47

ES 2 775 207 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 48
- 5 <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> LCDR1 MCSP ML2 (C5)

10 <400> 48

Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr Leu Asn
 1 5 10

- <210> 49
- <211> 7
- <212> PRT
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> LCDR2 MCSP ML2 (C5)

<400> 49

Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser
 1 5

- 20 <210> 50
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

<220>

<223> LCDR3 MCSP ML2 (C5)

<400> 50

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

5 <210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VL MCSP ML2 (C5-G3)

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 52

<211> 107

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL MCSP ML2

<400> 52

ES 2 775 207 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 53

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

10 <400> 53

ES 2 775 207 T3

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 54

5 <211> 685

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(botón) P329GLALA

10 <400> 54

ES 2 775 207 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

ES 2 775 207 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 245 250 255

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 260 265 270

Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 275 280 285

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 290 295 300

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 305 310 315 320

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
 325 330 335

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 340 345 350

Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 355 360 365

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 385 390 395 400

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 405 410 415

ES 2 775 207 T3

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 420 425 430
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 435 440 445
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 450 455 460
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 465 470 475 480
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 485 490 495
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 500 505 510
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 515 520 525
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 530 535 540
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 545 550 555 560
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 565 570 575
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
 580 585 590
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 595 600 605
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 610 615 620
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 625 630 635 640
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 645 650 655
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 660 665 670
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 675 680 685

<210> 55
 <211> 442
 5 <212> PRT

ES 2 775 207 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc(ojal) P329GLALA

<400> 55

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

5

ES 2 775 207 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

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

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

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

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 56

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 775 207 T3

<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 56

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

5 <210> 57

<211> 694

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(botón) P329GLALA

ES 2 775 207 T3

<400> 57

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

ES 2 775 207 T3

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
 225 230 235 240

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 245 250 255

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val
 260 265 270

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser
 275 280 285

Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 290 295 300

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 305 310 315 320

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
 325 330 335

Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 340 345 350

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 355 360 365

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 370 375 380

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 385 390 395 400

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 405 410 415

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 420 425 430

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 435 440 445

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 450 455 460

ES 2 775 207 T3

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
485 490 495

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
500 505 510

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
515 520 525

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
530 535 540

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
545 550 555 560

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
565 570 575

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
580 585 590

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
595 600 605

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
610 615 620

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
625 630 635 640

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
645 650 655

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
660 665 670

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
675 680 685

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690

<210> 58

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc(ojal) P329GLALA

<400> 58

ES 2 775 207 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

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

ES 2 775 207 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 59

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC DP47 GS

<400> 59

ES 2 775 207 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 60

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 60

ES 2 775 207 T3

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 61

5 <211> 688

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(botón) P329GLALA

10 <400> 61

ES 2 775 207 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 225 230 235 240
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 245 250 255
 Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 260 265 270

ES 2 775 207 T3

Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala
 275 280 285

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 290 295 300

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 305 310 315 320

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser
 325 330 335

Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 340 345 350

Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 355 360 365

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 370 375 380

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 385 390 395 400

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 405 410 415

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 420 425 430

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 435 440 445

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr
 450 455 460

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 465 470 475 480

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 485 490 495

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 500 505 510

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 515 520 525

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 530 535 540

ES 2 775 207 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
545 550 555 560

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
565 570 575

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
580 585 590

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
595 600 605

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
610 615 620

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
625 630 635 640

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
645 650 655

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
660 665 670

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680 685

<210> 62

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DP47 GS (VH-CH1) - Fc(ojal) P329GLALA

<400> 62

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

10

ES 2 775 207 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

ES 2 775 207 T3

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 63

<211> 1365

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 63

```

gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg      60
agctgtgccc ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc      120
cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc      180
tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc      240
ctgtacctgc agatgaacag cctgcggggc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgctg      300
cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacctc      360
gtgaccgtgt catctgctag caccaagggc ccatcggctt tccccctggc accctcctcc      420
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa      480
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct      540
gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc      600
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac      660
aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct      720
    
```

ES 2 775 207 T3

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aaccaagga caccctcatg 780
atctcccga cccctgaggt cacatgctg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1020
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1140
tatcccagcg acatgcacct ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagaa gctcaccgtg 1260
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa 1365

<210> 64

<211> 645

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 64

caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60
acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180
cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcggc 240
cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caaccaagg ctgccccag cgtgaccctg 360
ttcccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420
gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaaggcc acagcagccc cgtgaaggcc 480
ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540
ctgagcctga cccccagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgaccac 600
gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

10 <210> 65

<211> 375

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 775 207 T3

<223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 65

gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120
 cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180
 tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgcggggc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtcggg 300
 cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgccct actggggcca gggcacccctc 360
 gtgaccgtgt catct 375

<210> 66

5 <211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

10 <400> 66

acctacgcca tgaac 15

<210> 67

<211> 57

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 67

cggatcagaa gcaagtacaa caactacgcc acctactacg ccgacagcgt gaagggc 57

20 <210> 68

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 68

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgccct ac 42

ES 2 775 207 T3

<210> 69
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> VL CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 69

caggccgctg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60
 acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
 aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180
 cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240
 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 ggccggaggca ccaagctgac agtccta 327

<210> 70
 10 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

15 <400> 70

ggcagttcta caggcgccgt gaccaccagc aactacgcca ac 42

<210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 71

ggcaccaaca agagagcccc t 21

25 <210> 72
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

<220>

<223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 72

gccctgtggt acagcaacct gtgggtg 27

5 <210> 73

<211> 1326

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> HC MCSP M4-3 (C1)

<400> 73

caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120
caccocggca agggcctgga atggatcggc tacatcaactt tcgacggctc taacaactac 180
aaccocagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240
ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgccc cgacttcgac 300
tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgtc gcaccaaggg cccatcggtc 360
ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg 420
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480
ggcgtgcaca ccttccggc tgtcctacag tctcaggac tctactcct cagcagcgtg 540
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 600
cccagcaaca ccaagggtga caagaaagt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 660
tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttct cttccccca 720
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 780
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtcc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
acctgctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccc tggagtggga gagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc 1320
ggtaaa 1326

ES 2 775 207 T3

<210> 74
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> LC MCSP ML2 (G3)

<400> 74

```

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc      60
atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc      180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc      240
gaggacttog ccacctacta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcggccag      300
ggaacaaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcacat ctgtttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgtg gcctgctgaa taacttetat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctc gcgaagtac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          642
    
```

<210> 75
 10 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH MCSP M4-3 (C1)

15 <400> 75

```

caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg      60
acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag      120
caccocggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac      180
aaccocagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc      240
ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac      300
tactggggcc agggcaccct ggtcacctgt tccagc                                336
    
```

<210> 76
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

	<220>		
	<223>	HCDR1 MCSP M4-3 (C1)	
	<400>	76	
		agcggctatt attggaac	18
5	<210>	77	
	<211>	48	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	HCDR2 MCSP M4-3 (C1)	
	<400>	77	
		tacatcactt tcgacggctc taacaactac aaccccagcc tgaagtcc	48
	<210>	78	
	<211>	9	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	HCDR3 MCSP M4-3 (C1)	
	<400>	78	
20		ttcgactac	9
	<210>	79	
	<211>	321	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	VL MCSP ML2 (G3)	
	<400>	79	

ES 2 775 207 T3

		<code>gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc</code>	60
		<code>atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc</code>	120
		<code>ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc</code>	180
		<code>cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc</code>	240
		<code>gaggacttcg ccaccta cta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcggccag</code>	300
		<code>ggaacaaagg tggagatcaa g</code>	321
	<210>	80	
	<211>	33	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	LCDR1 MCSP ML2 (G3)	
	<400>	80	
		<code>cgggccagcc agggcatccg gaactacctg aac</code>	33
10	<210>	81	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
15	<223>	LCDR2 MCSP ML2 (G3)	
	<400>	81	
		<code>tacaccagca gcctgcacag c</code>	21
	<210>	82	
	<211>	27	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	LCDR3 MCSP ML2 (G3)	
	<400>	82	
25		<code>cagcagtact ctgctctgcc gtggacc</code>	27
	<210>	83	
	<211>	1353	
	<212>	ADN	

ES 2 775 207 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HC CEA CH1A1A 98-99

<400> 83

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggt 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgacctc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgccc cagatgggac 300
 ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agcgctagca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
 gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 5 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gcccaagaca agccggcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgca aaggctteta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 84

<211> 645

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC CEA 2F1

<400> 84

ES 2 775 207 T3

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc ggctgtgggt acgtatggtg cgtggatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaaggg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctggtg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcact acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 85

<211> 363

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH CEA CH1A1A 98-99

<400> 85

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccagccagg gcctogaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgccc cagatgggac 300
 ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agc 363

10 <210> 86

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HCDR1 CEA CH1A1A 98-99

<400> 86

gagttcggca tgaac

15

ES 2 775 207 T3

<210> 87
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99

<400> 87

tggatcaaca ccaagaccgg cgaggccacc tacgtggaag agtcaaggg c 51

<210> 88
 10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99

15 <400> 88

tgggacttcg cctattacgt ggaagccatg gactac 36

<210> 89
 <211> 324
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VL CEA 2F1

<400> 89

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc ggctgtgggt acgtatggtg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactotca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caag 324

25 <210> 90
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

<220>
 <223> LCDR1 CEA 2F1
 <400> 90
 aaggccagtg cggctgtggg tacgtatggt gcg 33

5 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> LCDR2 CEA 2F1
 <400> 91
 tcggcatcct accgcaaaag g 21
 <210> 92
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> LCDR3 CEA 2F1
 <400> 92
 20 caccaatatt acacctatcc tctattcacg 30
 <210> 93
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)
 <400> 93
 caggccgctcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60
 acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
 aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

ES 2 775 207 T3

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240
 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360
 cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420
 aaggattatt ttccctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480
 gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540
 acagtgccca gcagcagcct gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600
 agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 94

<211> 2055

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(botón) P329GLALA

<400> 94

caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120
 caccceggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180
 aaccceagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240
 ctgaagctgt ccagcgtgac agccgcccag accgcccgtg actactgcgc cgacttcgac 300
 tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgtc gcacaaaggg ccccagcgtg 360
 ttccctctgg ccctagcag caagagcaca tctggcggaa cagccgccct gggctgcctc 420
 gtgaaggact actttcccga gcctgtgacc gtgtcctgga actctggcgc cctgacaagc 480
 ggcgtgcaca cctttccagc cgtgctgcag agcagcggcc tgtactctct gagcagcgtg 540
 gtcaccgtgc ctagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600
 cccagcaaca ccaaagtgga caagaagggt gagcccaaga gctgtgatgg cggaggaggg 660
 tccggaggcg gaggatccga ggtgcagctg ctggaatctg gcggcggact ggtgcagcct 720
 ggcggatctc tgagactgag ctgtgccgcc agcggcttca ccttcagcac ctacgccatg 780
 aactgggtgc gccaggcccc tggcaaaggc ctggaatggg tgtcccggat cagaagcaag 840
 tacaacaact acgccaccta ctacgccgac agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg 900
 gacgacagca agaaccacct gtacctgcag atgaacagcc tgcgggcccga ggacaccgcc 960
 gtgtactatt gtgtgcggca cggcaacttc ggcaacagct atgtgtcttg gtttgcctac 1020
 tggggccagg gcaccctcgt gaccgtgtca agcgcctagc tggccgctcc ctccgtgttt 1080

ES 2 775 207 T3

atctttcccc catccgatga acagctgaaa agcggcaccg cctccgtcgt gtgtctgctg 1140
 aacaatTTTT accctagggg agctaaagtg cagtggaaag tggataacgc actgcagtcc 1200
 ggcaactccc aggaatctgt gacagaacag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 1260
 tccaccctga cactgtctaa ggctgattat gagaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 1320
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgacaag 1380
 acccacacct gtcccccttg tctgcccct gaagctgctg gcggcccttc tgtgttctg 1440
 ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atcagccgga ccccgaagt gacctgcgtg 1500
 gtggtggatg tgtcccacga ggaccctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 1560
 gaagtgcaca acgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1620
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1680
 gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1740
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1800
 gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatgcctgt ggagtgggag 1860
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1920
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1980
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 2040
 ctgtctccgg gtaaa 2055

<210> 95

<211> 1326

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc(ojal) P329GLALA

<400> 95

caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120
 cccccggca aggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180
 aaccacagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240
 ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300
 tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgcta gcaccaaggc cccctccgtg 360
 ttccccctgg ccccagcag caagagcacc agcggcggca cagccgctct gggctgcctg 420
 gtcaaggact acttccccga gcccgtagcc gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc 480
 ggcgtagaca ccttccccgc cgtgctgcag agttctggcc tgtatagcct gagcagcgtg 540

ES 2 775 207 T3

gtcaccgtgc cttctagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600
cccagcaaca ccaaggtgga caagaagggtg gagcccaaga gctgcgacaa aactcacaca 660
tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca 720
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgctg ggtggtggac 780
gtgagccaag aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
aaagccctcg gcgccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020
ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc 1080
tcgtgcgagc tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1200
ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320
ggtaaa 1326

<210> 96

<211> 642

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 96

caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60
acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
aagcccggcc aggcttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180
cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240
cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgctcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360
cctctggctc ctagctcaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420
aaggattatt ttctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480
gtgcatactt tccccgtgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540
acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600
agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

10 <210> 97

<211> 2082

<212> ADN

ES 2 775 207 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(botón) P329GLALA

<400> 97

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg	60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggcc	120
cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180
gtggaagagt tcaagggcag agtgacctc accaccgaca ccagcaccag caccgcctac	240
atggaactgc ggagcctgag aagcgcagac accgcctgt actactgccc cagatgggac	300
ttcgcctact atgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360
agtgctagca caaagggccc cagcgtgttc cctctggccc ctacgagcaa gagcacatct	420
ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact ttcccagacc cgtgacagtg	480
tcctggaact ctggcgccct gacaagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgacagac	540
agcggcctgt actctctgag cagcgtggtc accgtgccta gctctagcct gggcaccag	600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtgaa	660
cccaagagct gcgatggcgg aggcggctcc ggaggcggag gatccgaggt gcagctgctg	720
gaatctggcg gggactggg gcagcctggc ggatctctga gactgagctg tgccgccagc	780
ggcttcacct tcagcaccta cgccatgaac tgggtgccc agggcccctgg caaaggcctg	840
gaatgggtgt cccggatcag aagcaagtac aacaactacg ccacctacta cgccgacagc	900
gtgaagggcc ggttcacct cagccgggac gacagcaaga acaccctgta cctgacagtg	960
aacagcctgc gggccgagga caccgcctg tactattgtg tgccggcacgg caacttcggc	1020
aacagctatg tgtcttggtt tgcctactgg ggcagggca ccctcgtgac cgtgtcaagc	1080
gctagcgtgg ccgctccctc cgtgtttatc tttcccccac ccgatgaaca gctgaaaagc	1140
ggcaccgcct ccgctcgtg tctgctgaac aatttttacc ctagggaaagc taaagtgcag	1200
tggaaagtgg ataacgcaact gcagtcggc aactcccagg aatctgtgac agaacaggac	1260
tccaaggaca gcacctact cctgtcctcc accctgacac tgtctaaggc tgattatgag	1320
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag	1380
agcttcaaca ggggagagtg tgacaagacc cacacctgtc cccttgtcc tgcccctgaa	1440
gctgctggcg gcccttctgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc	1500
agccggacce ccgaagtgac ctgcgtggg gtggatgtgt ccacagagga cctgaagtg	1560
aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagacaaa gccgcgggag	1620
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg	1680

5

ES 2 775 207 T3

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag 1740
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1800
 tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctgggtcaa aggcttctat 1860
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1920
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctctc acagcaagct caccgtggac 1980
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2040
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 2082

<210> 98

<211> 1353

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc(ojal) P329GLALA

<400> 98

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agcgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgctctggg ttgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540
 tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
 cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
 ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgcccc atcccggat 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcagc 1140

ES 2 775 207 T3

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact cggacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 99

<211> 645

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> LC DP47 GS

<400> 99

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctggtg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgccaagt cacccatcag 600
 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

10 <210> 100

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 100

ES 2 775 207 T3

caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60
 acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
 aagcccggcc aggccctcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180
 cctgccagat tcagcggatc tctgctggga gaaagggccg ccctgacact gtctggcgcc 240
 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360
 cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420
 aaggattatt ttctgagcc tgtgacagtg tcctggaata ggggagcact gacctctgga 480
 gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540
 acagtcccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600
 agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 101

<211> 2064

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(botón) P329GLALA

<400> 101

ES 2 775 207 T3

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag cacaaagggc 360
 cccagcgtgt tcctctggc ccctagcagc aagagcacat ctggcggaac agccgccctg 420
 ggctgcctcg tgaaggacta ctttcccgag cctgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc 480
 ctgacaagcg gcgtgcacac ctttccagcc gtgctgcaga gcagcggcct gtactctctg 540
 agcagcgtgg tcaccgtgcc tagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgtgatggc 660
 ggaggagggg ccggaggcgg aggatccgag gtgcagctgc tggaatctgg cggcggactg 720
 gtgcagcctg gcggatctct gagactgagc tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc 780
 tacgccatga actgggtgcg ccaggcccct ggcaaaggcc tggaatgggt gtcccggatc 840
 agaagcaagt acaacaacta cgccacctac tacgccgaca gcgtgaaggg ccggttcacc 900
 atcagccggg acgacagcaa gaacaccctg tacctgcaga tgaacagcct gcgggcccag 960
 gacaccgccg tgtactattg tgtgcggcac ggcaacttcg gcaacagcta tgtgtcttgg 1020
 tttgcctact ggggccaggg caccctcgtg accgtgtcaa gcgctagcgt ggccgctccc 1080
 tccgtgttta tctttcccc atccgatgaa cagctgaaaa gcggcaccgc ctccgtcgtg 1140
 tgtctgctga acaattttta ccctagggaa gctaaagtgc agtggaaagt ggataacgca 1200
 ctgcagtccg gcaactccca ggaatctgtg acagaacagg actccaagga cagcacctac 1260
 tcctgtcct ccaccctgac actgtctaag gctgattatg agaaacacaa agtctacgcc 1320
 tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag 1380
 tgtgacaaga cccacacctg tccccctgt cctgcccctg aagctgctgg cggcccttct 1440
 gtgttctctg tcccccaaa gcccaaggac accctgatga tcagccggac ccccgaagtg 1500
 acctgcgtgg tggaggatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 1560
 gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagaca aagcccgggg aggagcagta caacagcacg 1620
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1680
 aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1740
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1800
 aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1860
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1920
 tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag 1980
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag 2040
 agcctctccc tgtctccggg taaa 2064

ES 2 775 207 T3

<211> 1335
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> DP47 GS (VH-CH1) - Fc(ojal) P329GLALA

<400> 102

```

gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccagget      120
ccagggaagg ggtcggagtg ggtctcagct attagtggt a gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc      360
ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc      480
ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg      540
agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa      660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc      720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gagggtgata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag      1020
ccccgagaac cacaggtgtg caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag      1080
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag      1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      1200
tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc      1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc      1320
ctgtctccgg gtaaa
    
```

<210> 103

10 <211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

ES 2 775 207 T3

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 104

5 <211> 198

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 104

ES 2 775 207 T3

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195

<210> 105

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector

<400> 105

10 Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 106

<211> 15

ES 2 775 207 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> conector

5 <400> 106

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 107
 <211> 227
 <212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 107

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

ES 2 775 207 T3

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 108

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido líder

<400> 108

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

10 <210> 109

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 775 207 T3

<210> 113
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido líder
 <400> 113

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

10 <210> 114
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido líder

15 <400> 114

atgggatgga gctgtatcat cctcttctg gtagcaacag ctaccggtg gcattcc 57

<210> 115
 <211> 57
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido líder

<400> 115

atgggctggt cctgcatcat cctgttctg gtggctaccg ccaactggagt gcattcc 57

25 <210> 116
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> péptido líder

<400> 116

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct

57

<210> 117

<211> 643

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 117

Leu Ser Leu Glu Gly Ser Arg Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr
 20 25 30

Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly

ES 2 775 207 T3

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly
 290 295 300
 Gly Gly Pro Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser
 305 310 315 320
 Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe
 325 330 335
 Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu
 340 345 350
 Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Gln Ala Pro
 355 360 365
 Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln
 370 375 380
 Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu
 385 390 395 400
 Ile Gln Gly Pro Lys Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Ala
 405 410 415
 Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
 420 425 430
 Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu
 435 440 445
 Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Ile Thr Val Arg Ala
 450 455 460
 Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu
 465 470 475 480
 Arg Leu Asp Pro Thr Ile Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr
 485 490 495
 Gly Ser Val Pro His Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg
 500 505 510
 Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu
 515 520 525
 Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu
 530 535 540

ES 2 775 207 T3

Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Thr Gly Asp Ser
545 550 555 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser
565 570 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val
580 585 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Thr Arg Met Glu Ala Gly Lys Pro
595 600 605

Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro
610 615 620

Val Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Gly Phe Leu Glu Ala Asn
625 630 635 640

Met Phe Ser

<210> 118

<211> 643

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 118

Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr
20 25 30

Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly
35 40 45

Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn
50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu
65 70 75 80

Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala
100 105 110

ES 2 775 207 T3

Val Ser Phe Glu Ala Ala Cys Pro Gln His Pro Ser His Leu Trp Lys
 115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val
 130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln
 145 150 155 160

Arg Ser Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg
 165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
 180 185 190

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
 195 200 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln
 210 215 220

Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
 225 230 235 240

Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
 245 250 255

Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg
 260 265 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
 275 280 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly
 290 295 300

Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser
 305 310 315 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe
 325 330 335

Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu
 340 345 350

Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro
 355 360 365

ES 2 775 207 T3

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln
 370 375 380

Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu
 385 390 395 400

Ile Gln Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr
 405 410 415

Ser Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
 420 425 430

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu
 435 440 445

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala
 450 455 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu
 465 470 475 480

Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr
 485 490 495

Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg
 500 505 510

Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu
 515 520 525

Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu
 530 535 540

Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser
 545 550 555 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser
 565 570 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val
 580 585 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro
 595 600 605

Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro
 610 615 620

Glu Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn
 625 630 635 640

Met Phe Ser

<210> 119

ES 2 775 207 T3

<211> 428
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> NABA-avi-his

<400> 119

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
 35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
 50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
 85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

Met Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
 165 170 175

ES 2 775 207 T3

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
195 200 205

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn
225 230 235 240

Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr
245 250 255

Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr
260 265 270

Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Leu Ser
275 280 285

Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
290 295 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly
305 310 315 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
340 345 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile
355 360 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala
370 375 380

Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln
385 390 395 400

Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
405 410 415

Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
420 425

<210> 120

<211> 360

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 775 207 T3

<223> CD3e tallo-Fc(botón)-Avi

<400> 120

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
85 90 95

Val Ser Glu Asn Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser
100 105 110

Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130 135 140

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145 150 155 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
165 170 175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
195 200 205

ES 2 775 207 T3

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 225 230 235 240

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 275 280 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
 340 345 350

Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 355 360

<210> 121

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CD3d tallo-Fc(ojal)

<400> 121

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
 1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
 20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
 35 40 45

ES 2 775 207 T3

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Arg Ser Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
65 70 75 80

Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
85 90 95

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
100 105 110

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
115 120 125

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
130 135 140

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
165 170 175

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
180 185 190

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
195 200 205

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
210 215 220

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
225 230 235 240

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
245 250 255

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
260 265 270

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
275 280 285

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
290 295 300

Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
305 310 315 320

Ile Glu Trp His Glu
325

<210> 122

<211> 658

ES 2 775 207 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 122

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

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Ala Ser Ser Ser Thr Gly Ala
20 25 30

Asp Pro Arg His Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly
35 40 45

Arg Leu Leu His Ala Gln Gln Gly Ser Ala Glu Glu Val Leu Val Asn
50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Asn Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu
65 70 75 80

Met Ser Ser Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Ile Gly Leu Leu
85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Leu Ala Ala Thr Leu Ala Val Met
100 105 110

Val Ser Phe Asp Ala Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser Arg Leu Trp Lys
115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Lys Ile Thr Val
130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ala Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ala Ser Gln
145 150 155 160

Arg Ser Arg His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Thr Arg
165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Arg Arg Pro Tyr
180 185 190

ES 2 775 207 T3

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
 195 200 205
 Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe Arg Phe Arg Ala His Leu Gln
 210 215 220
 Gly Pro Thr Gly Thr Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
 225 230 235 240
 Val Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
 245 250 255
 Ser Ile Pro Leu Arg Val Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Val Ser Arg
 260 265 270
 Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
 275 280 285
 Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Ala Gly
 290 295 300
 Asp Asn Thr Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ala
 305 310 315 320
 Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe
 325 330 335
 Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Ile Pro Met Ser Leu
 340 345 350
 Ala Val Asp Val Leu Pro Ser Thr Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro
 355 360 365
 Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Thr Ser Leu Ser Arg Gln Gln
 370 375 380
 Leu Gln Val Ile Ser Asp Arg Glu Glu Pro Asp Val Ala Tyr Arg Leu
 385 390 395 400
 Thr Gln Gly Pro Leu Tyr Gly Gln Leu Leu Val Gly Gly Gln Pro Ala
 405 410 415
 Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Val Asp Gln Gly Asp Val Val Phe Val
 420 425 430
 Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser Gln Asp His Phe Lys Val Val Ala Leu
 435 440 445

ES 2 775 207 T3

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Thr Val Asn Val Thr Val Gln Ala
 450 455 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Thr Thr Leu
 465 470 475 480

Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Ser Glu Leu Ala Asn Arg Thr
 485 490 495

Gly Ser Met Pro His Phe Arg Leu Leu Ala Gly Pro Arg Tyr Gly Arg
 500 505 510

Val Val Arg Val Ser Gln Gly Arg Thr Glu Ser Arg Ser Asn Gln Leu
 515 520 525

Val Glu His Phe Thr Gln Arg Asp Leu Glu Glu Gly Gln Leu Gly Leu
 530 535 540

Glu Val Gly Lys Pro Glu Gly Arg Ser Thr Gly Pro Ala Gly Asp Arg
 545 550 555 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Lys Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Leu
 565 570 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr His Ala Ala Lys Ser Tyr Ser Val
 580 585 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Val Arg Thr Glu Thr Glu Lys Pro
 595 600 605

Gly Arg Ser Val Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gln Ala Ala Ser Ser Pro
 610 615 620

Val Pro Thr Ala Ala Lys Gly Gly Val Asp Gly Leu Asn Asp Ile Phe
 625 630 635 640

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His
 645 650 655

His His

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que comprende
- 5 (i) un primer resto de unión a antígeno que es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CD3, que comprende la región determinante de la complementariedad 1 (CDR) de la cadena pesada de SEQ ID NO: 4, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 5, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 6, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 8, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10, en el que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se intercambian;
- 10 (ii) un segundo y un tercer resto de unión a antígeno, cada uno de los cuales es una molécula Fab que se puede unir específicamente a CEA, que comprende la CDR 1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24, la CDR 2 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25, la CDR 3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26, la CDR 1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 28, la CDR 2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 29 y la CDR 3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 30;
- 15 (iii) un dominio Fc compuesto de una primera y una segunda subunidad que se pueden asociar de manera estable,
- 20 en el que el segundo resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer resto de unión a antígeno, y el primer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en el que el tercer resto de unión a antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.
- 25 2. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la reivindicación 1, en la que el primer resto de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
- 30 3. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la reivindicación 1 o 2, en la que el segundo y el tercer resto de unión a antígeno comprende cada uno una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.
- 35 4. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el primer resto de unión a antígeno es una molécula Fab de entrecruzamiento en la que las regiones constantes de la cadena ligera de Fab y de la cadena pesada de Fab se intercambian y que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y en la que cada uno del segundo y el tercer resto de unión a antígeno es una molécula Fab convencional que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.
- 40 5. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, específicamente un dominio Fc de IgG₁.
- 45 6. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el dominio Fc es un dominio Fc humano.
- 50 7. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc.
- 55 8. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la reivindicación 7, en la que, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más grande, generando de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que es posicionable en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que es posicionable la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.
- 60 65

- 5 9. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza el residuo de treonina en la posición 366 por un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza el residuo de tirosina en la posición 407 por un residuo de valina (Y407V); y en la que opcionalmente
- 10 (a) en la segunda subunidad del dominio Fc adicionalmente se reemplaza el residuo de treonina en la posición 366 por un residuo de serina (T366S) y se reemplaza el residuo de leucina en la posición 368 por un residuo de alanina (L368A); y/o
- 15 (b) en la primera subunidad del dominio Fc se reemplaza adicionalmente el residuo de serina en la posición 354 por un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc se reemplaza adicionalmente el residuo de tirosina en la posición 349 por un residuo de cisteína (Y349C) (numeración EU de acuerdo con Kabat).
- 20 10. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el dominio Fc comprende una o más sustituciones aminoacídicas que reducen la unión a un receptor de Fc, en particular un receptor de Fc γ , y/o función efectora, en particular citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 25 11. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de la reivindicación 10, en la que dicha una o más sustituciones aminoacídicas están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración EU de acuerdo con Kabat).
- 30 12. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones aminoacídicas L234A, L235A y P329G (numeración EU de acuerdo con Kabat).
- 35 13. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que consiste en el primer, el segundo y el tercer resto de unión a antígeno, el dominio Fc, y opcionalmente uno o más conectores peptídicos.
- 40 14. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 22, una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 56, una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 57, y una secuencia polipeptídica que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 58.
- 45 15. Un polinucleótido o pluralidad de polinucleótidos aislados que codifican la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 50 16. Una célula huésped que comprende el polinucleótido o pluralidad de polinucleótidos de la reivindicación 15.
- 55 17. Un procedimiento de producción de una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T que se puede unir específicamente a CD3 y CEA, que comprende las etapas de a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 16 en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T y b) recuperar la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T.
- 60 18. Una molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T producida por el procedimiento de la reivindicación 17.
- 65 19. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o 18 o la composición farmacéutica de la reivindicación 19 para su uso como medicamento.
21. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o 18 o la composición farmacéutica de la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que necesita el mismo.
22. La molécula de unión a antígeno biespecífica activadora de linfocitos T o la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad de la reivindicación 21, en el que la enfermedad es cáncer.

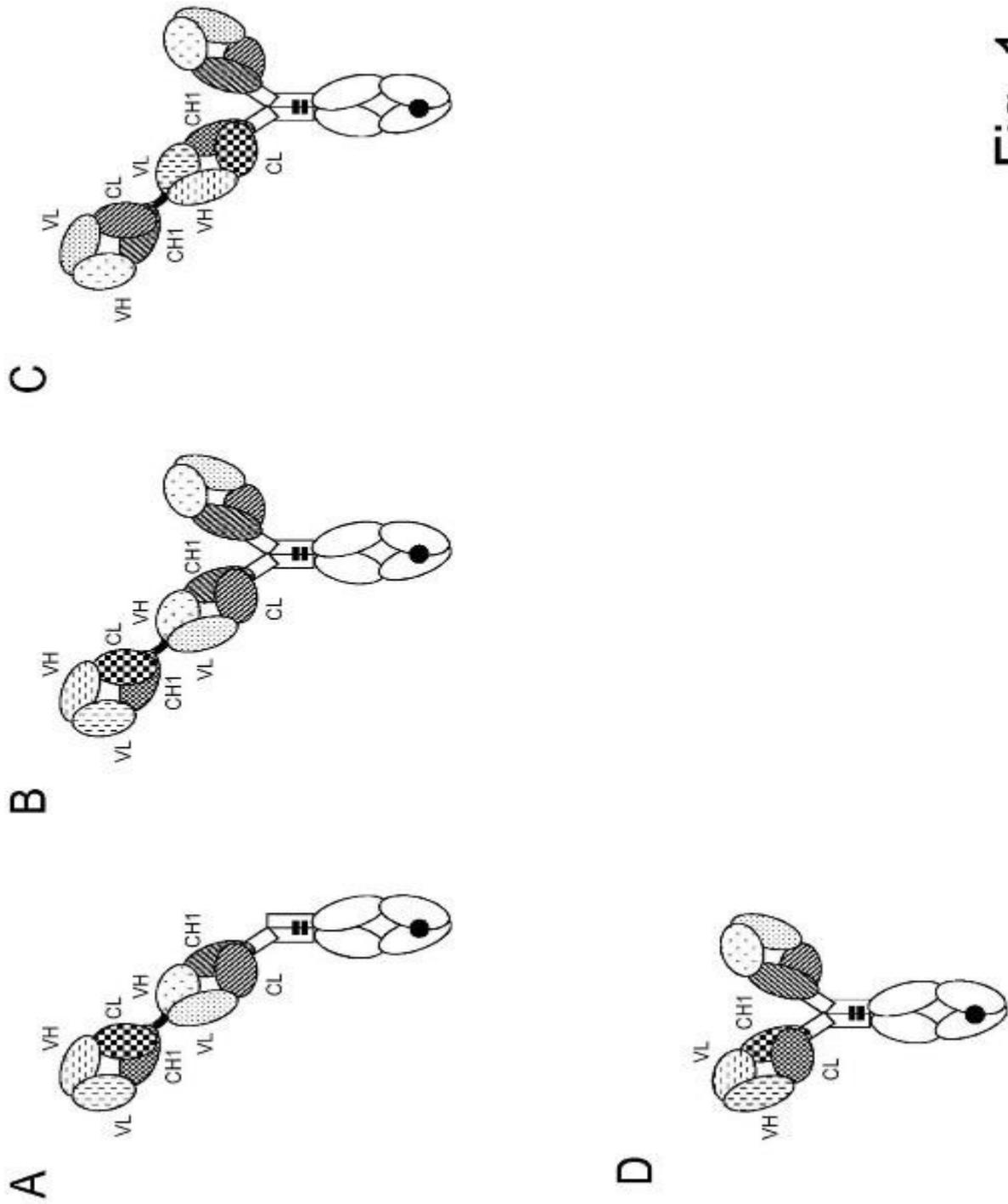


Fig. 1

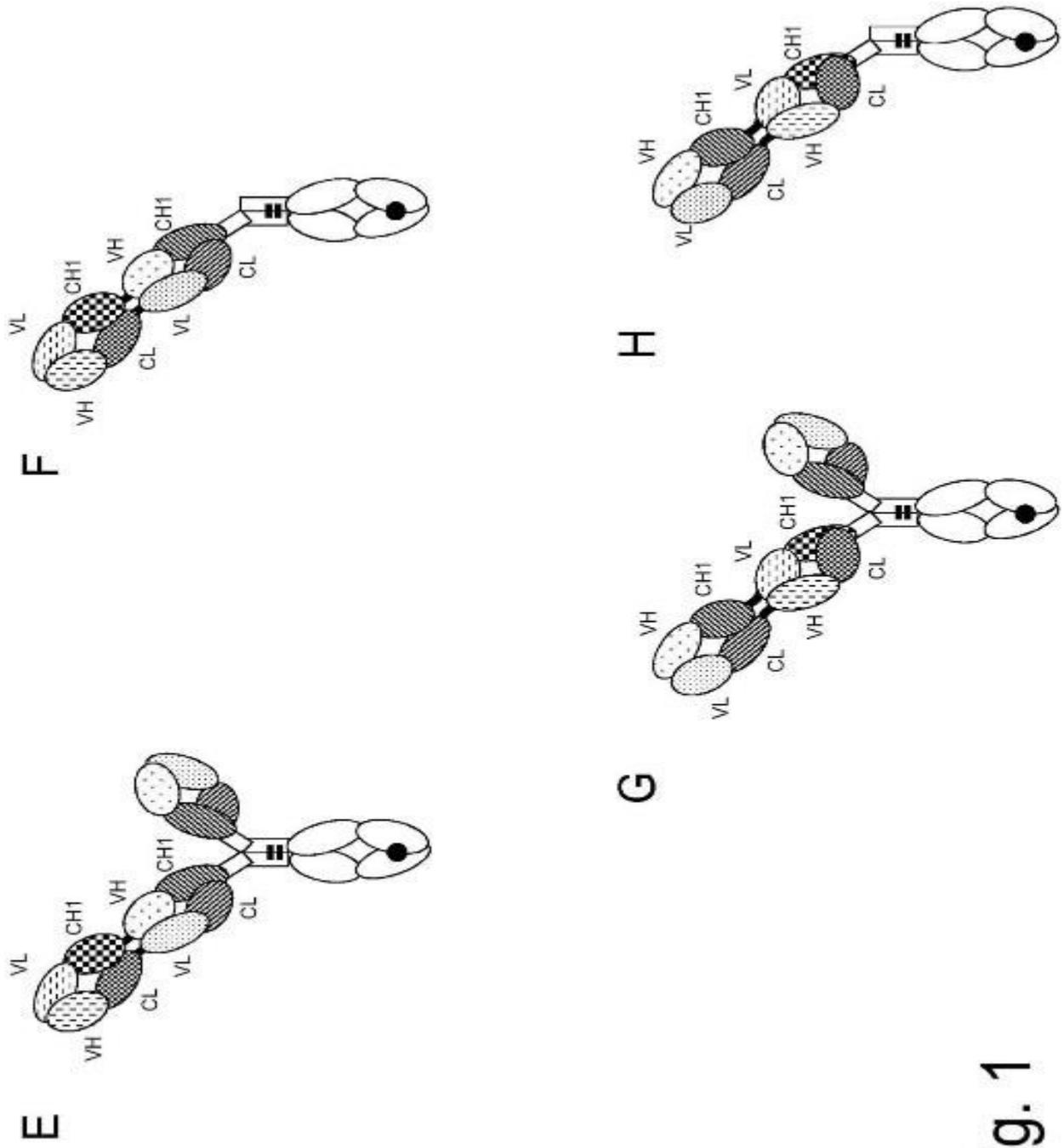


Fig. 1

HC original	1 QVQLQESGPGLVKPSQTLISLTCTVYGGSIITSGYYTNNWIRQHPGKGLEWIGYITDGSNNYNPFIKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLLVTVSS
D6 (SEQ ID NO: 14)	1F..K.....
A7 (SEQ ID NO: 36)	1D.....F..R.....
B7 (SEQ ID NO: 39)	1F..I.....
B8 (SEQ ID NO: 41)	1F..R.....
C1 (SEQ ID NO: 13)	1F.....
LC original	1 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGIKRNLYNWYQKPGKAPKLLIYYTSSLSHGVPFRFSGSGGTDFTLTISLSLQPEDFATYYCQQYKLPWTFGGTKVEIK
G3 (SEQ ID NO: 17)	1Y.....Y.....A.....
E10 (SEQ ID NO: 43)	1Y...G.....H.....
E10-G3 (SEQ ID NO: 46)	1Y...G.....H.....A.....
C5 (SEQ ID NO: 47)	1R...E.....G.....E.....
C5-G3 (SEQ ID NO: 51)	1R...E.....G.....A.....

Fig. 2

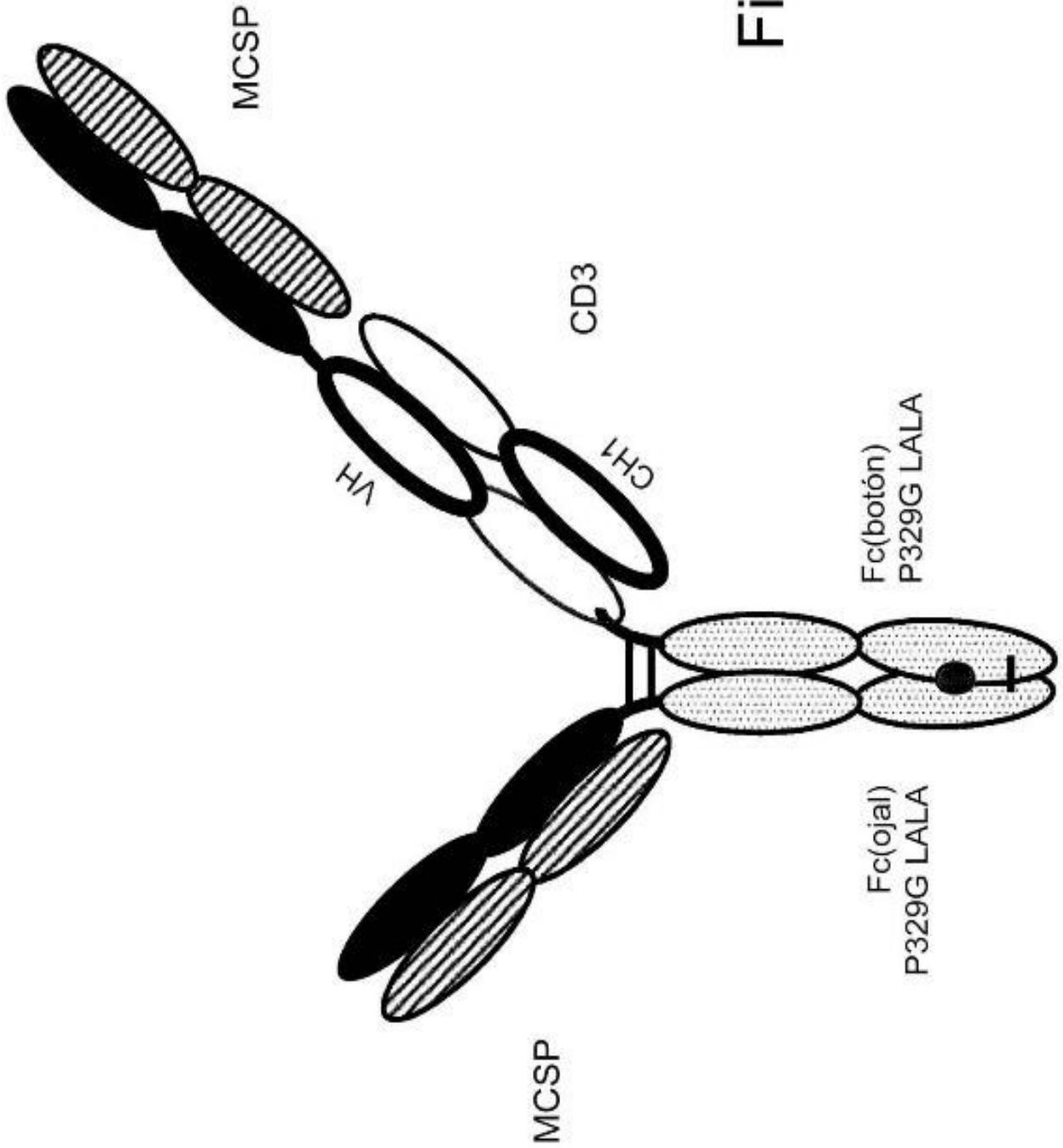


Fig. 3

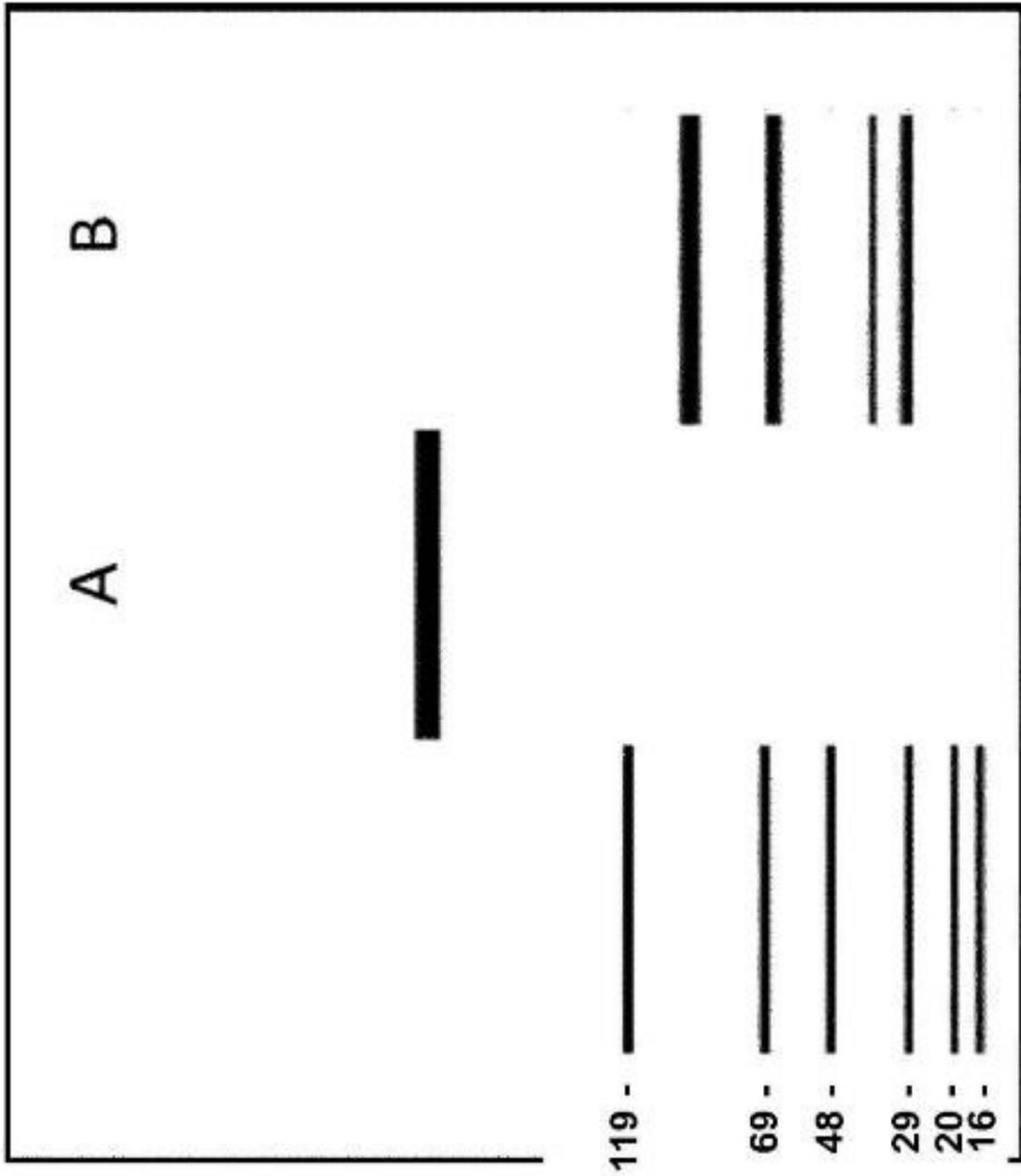


Fig. 4

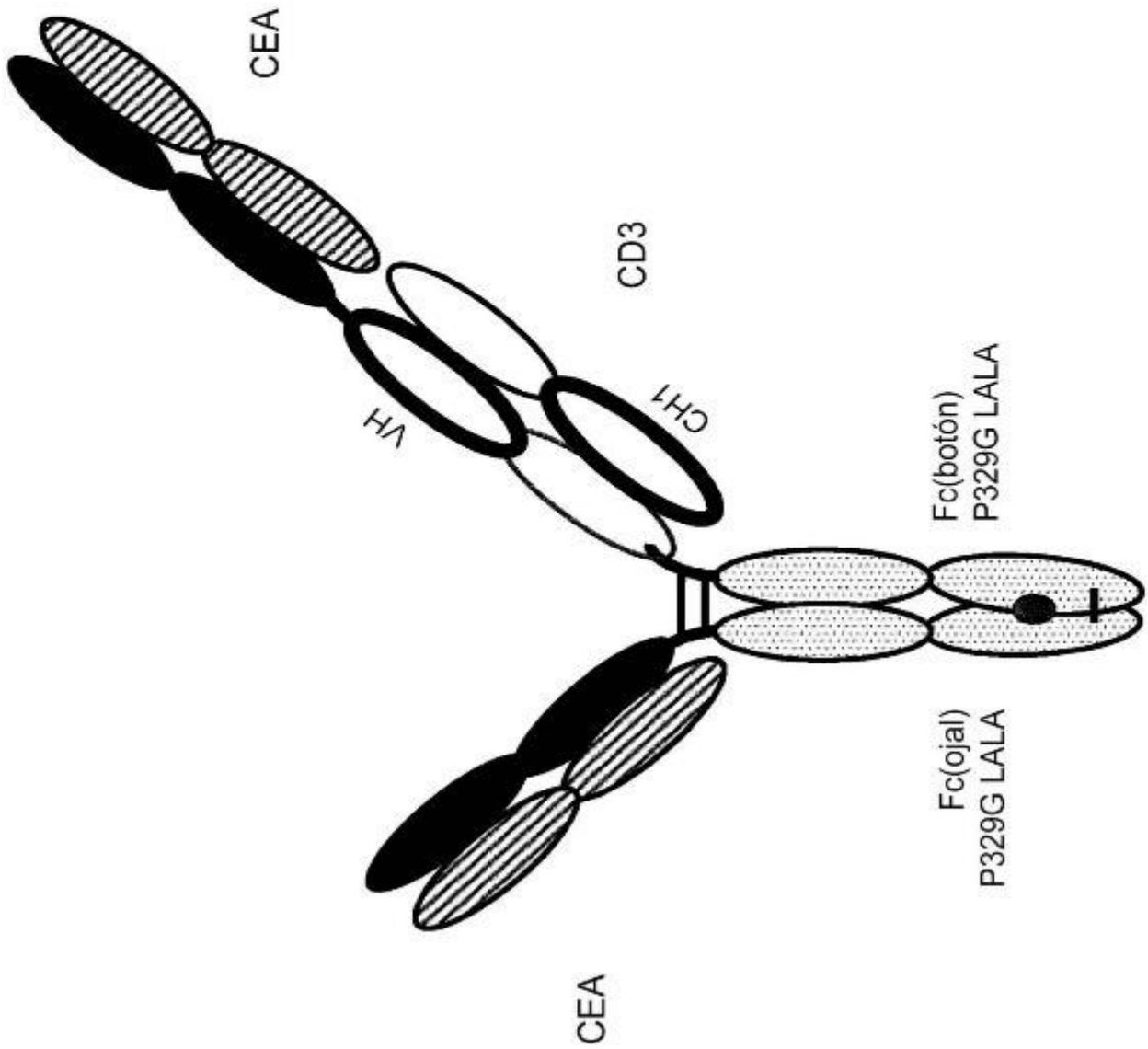


Fig. 5

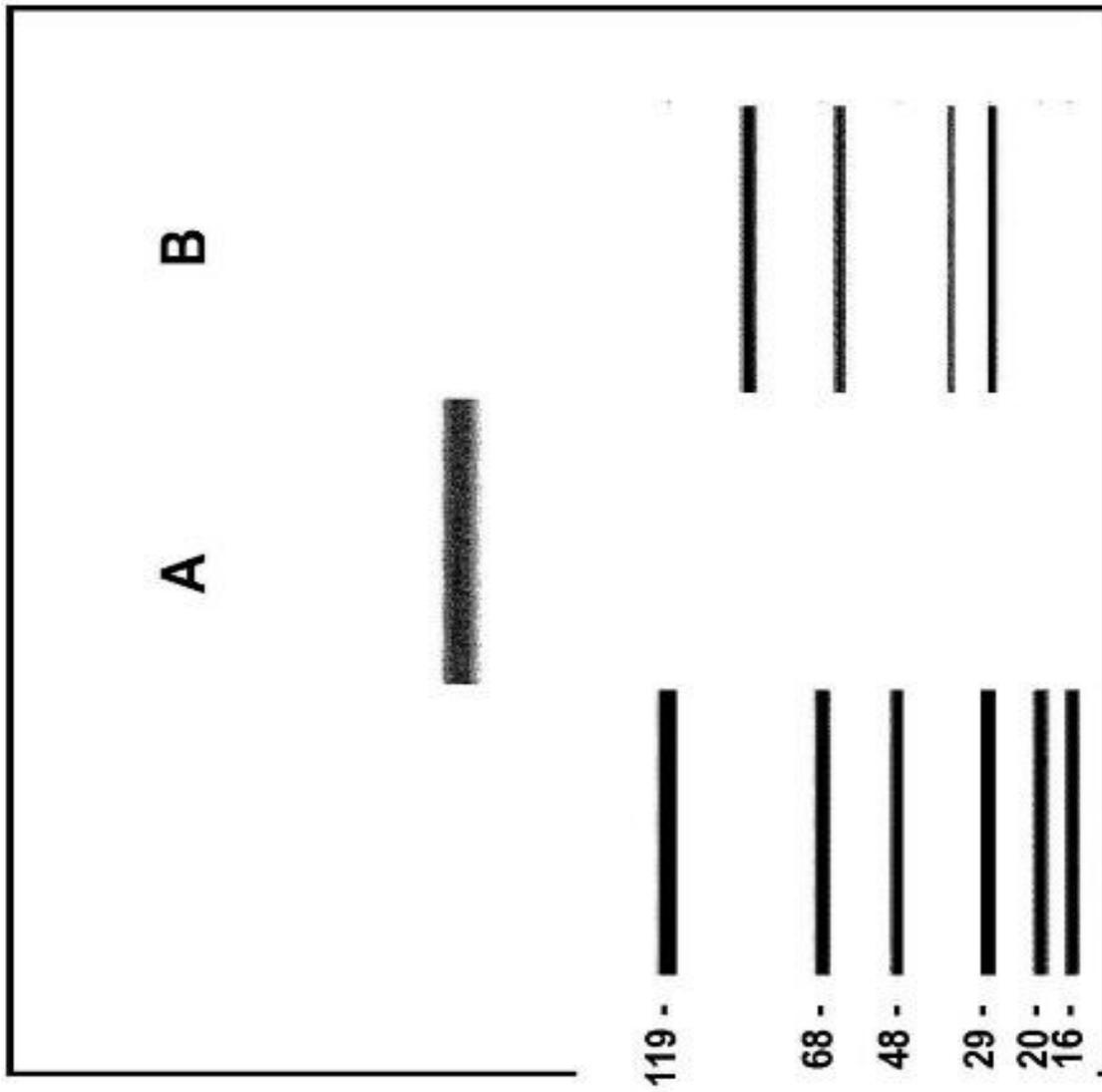


Fig. 6

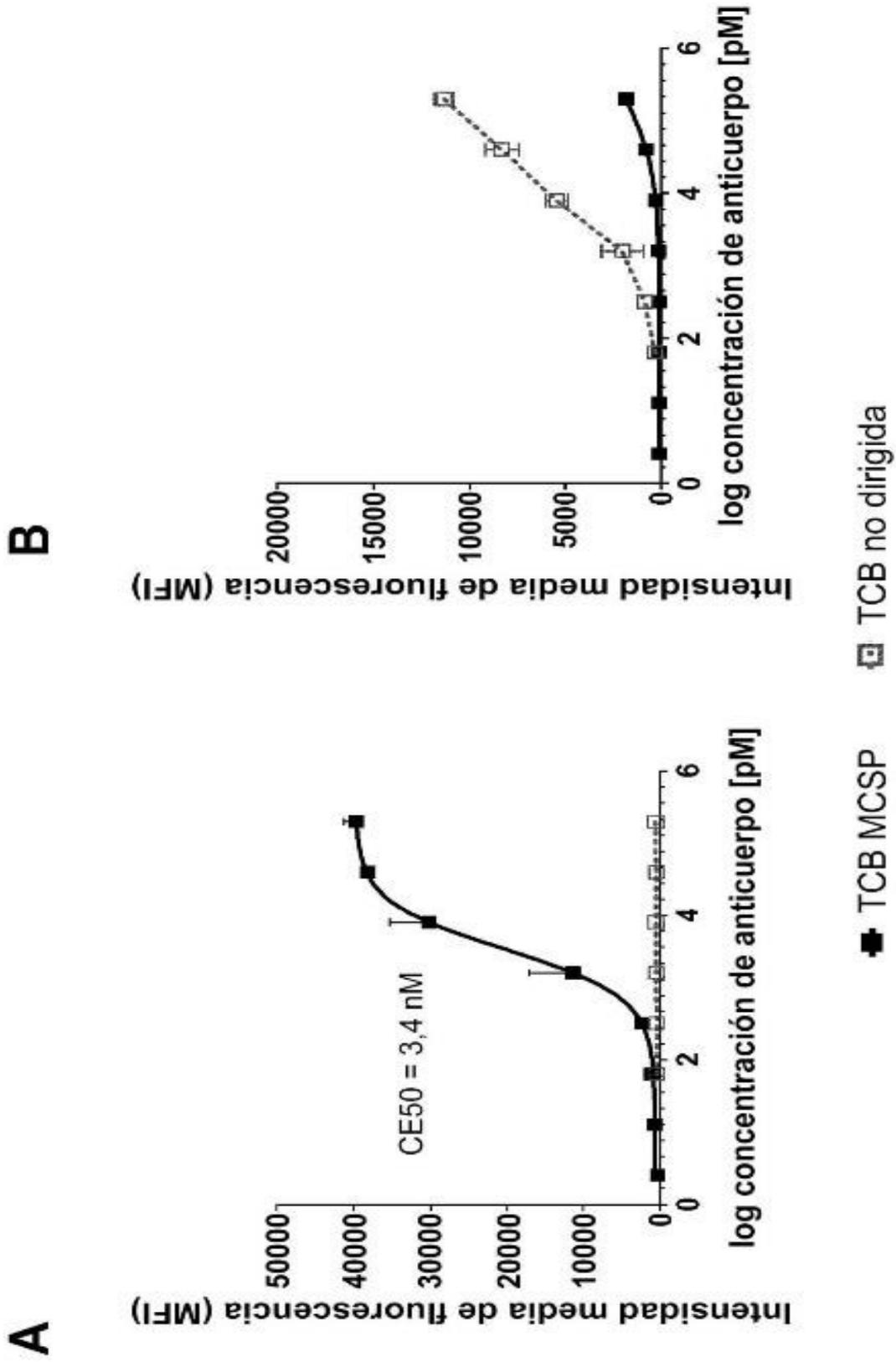


Fig. 7

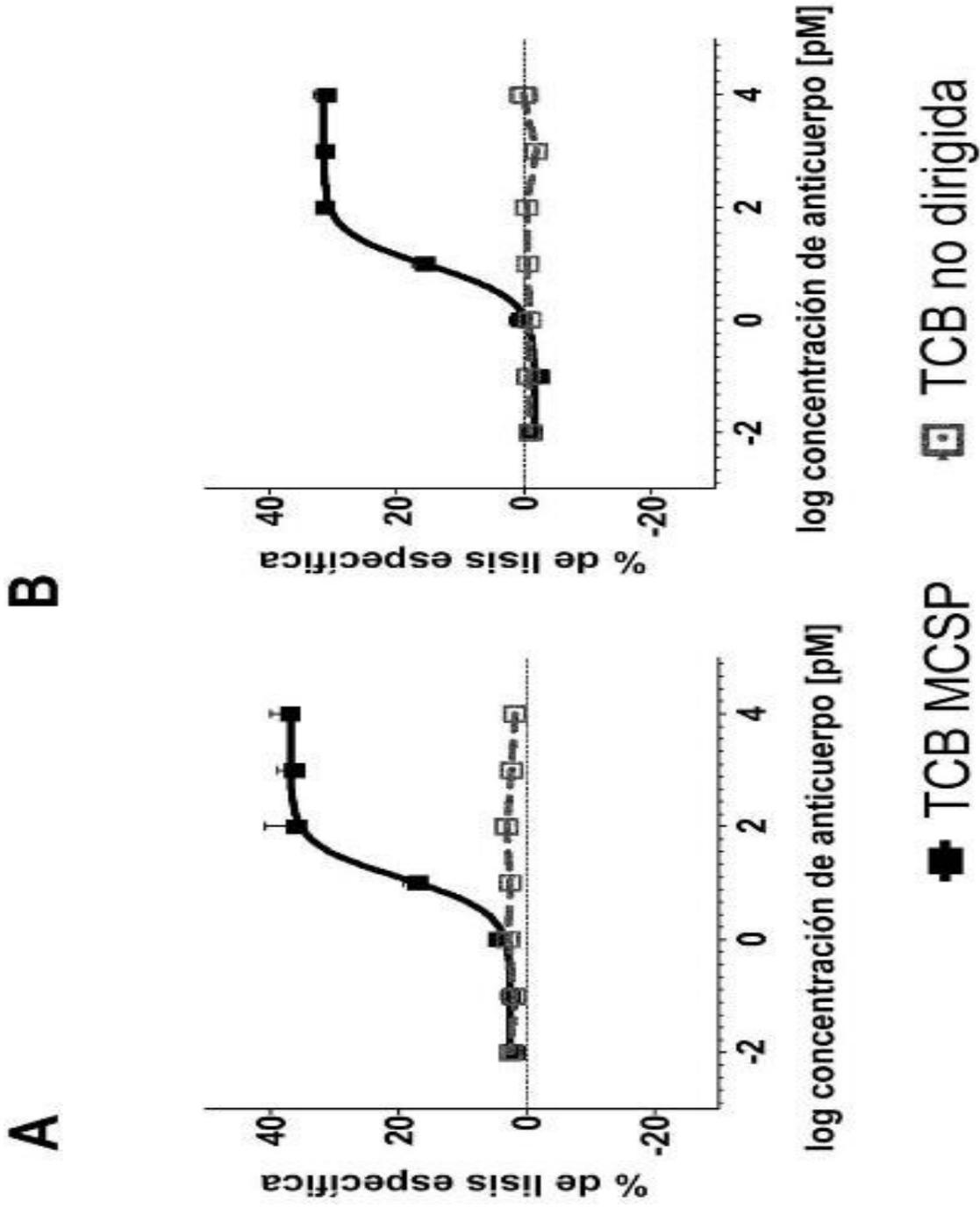
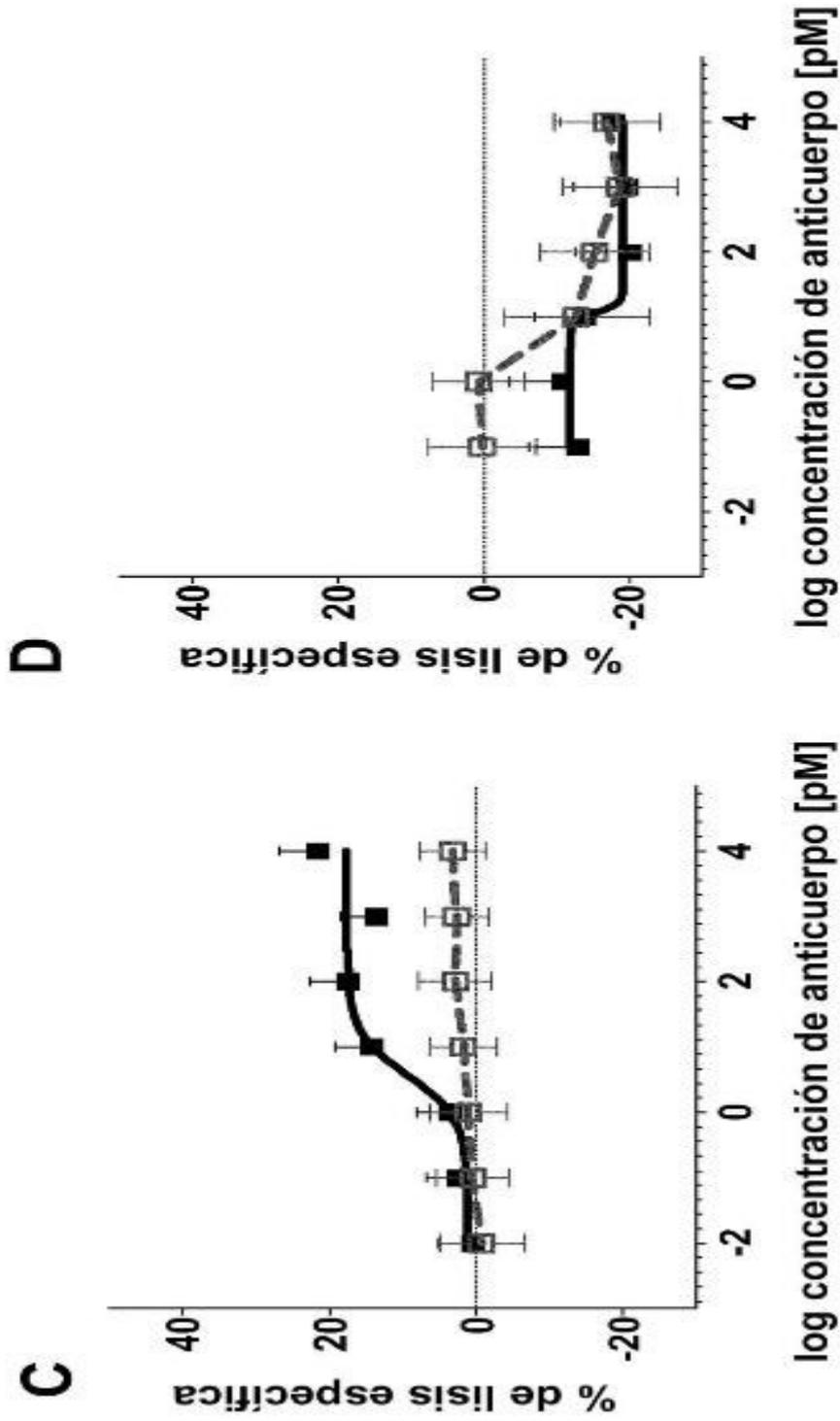


Fig. 8



■ TCB MCSP □ TCB no dirigida

Fig. 8

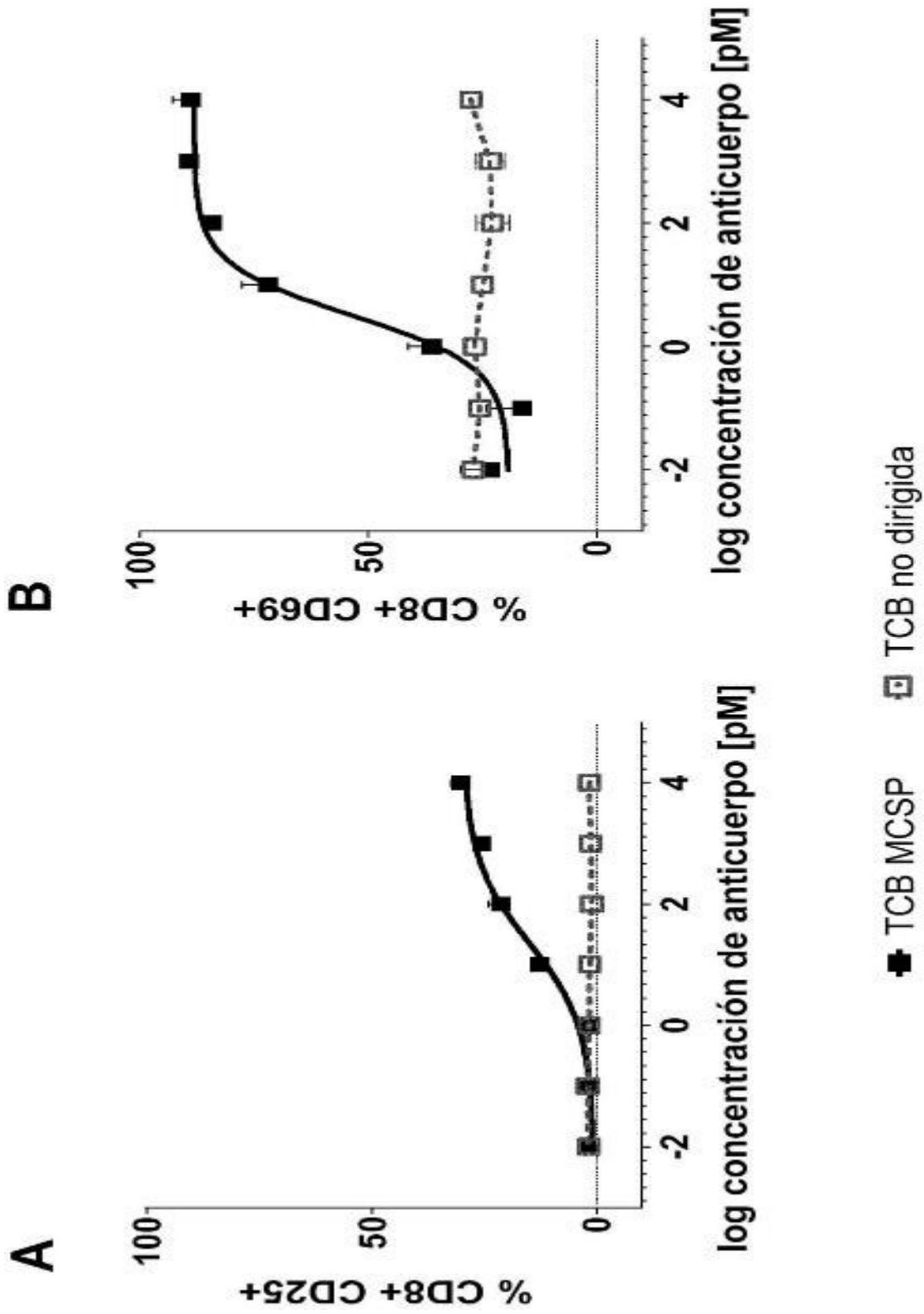


Fig. 9

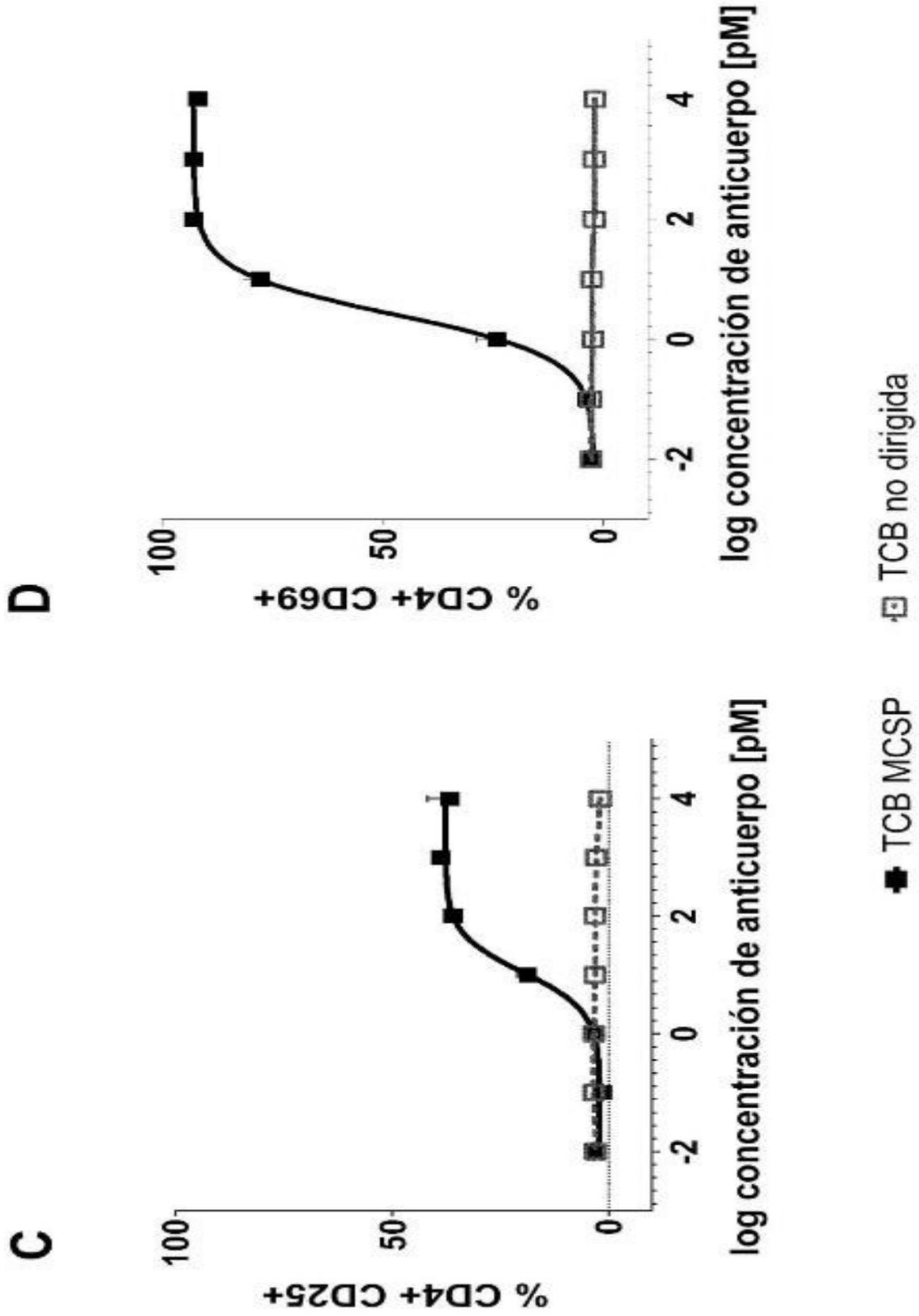


Fig. 9

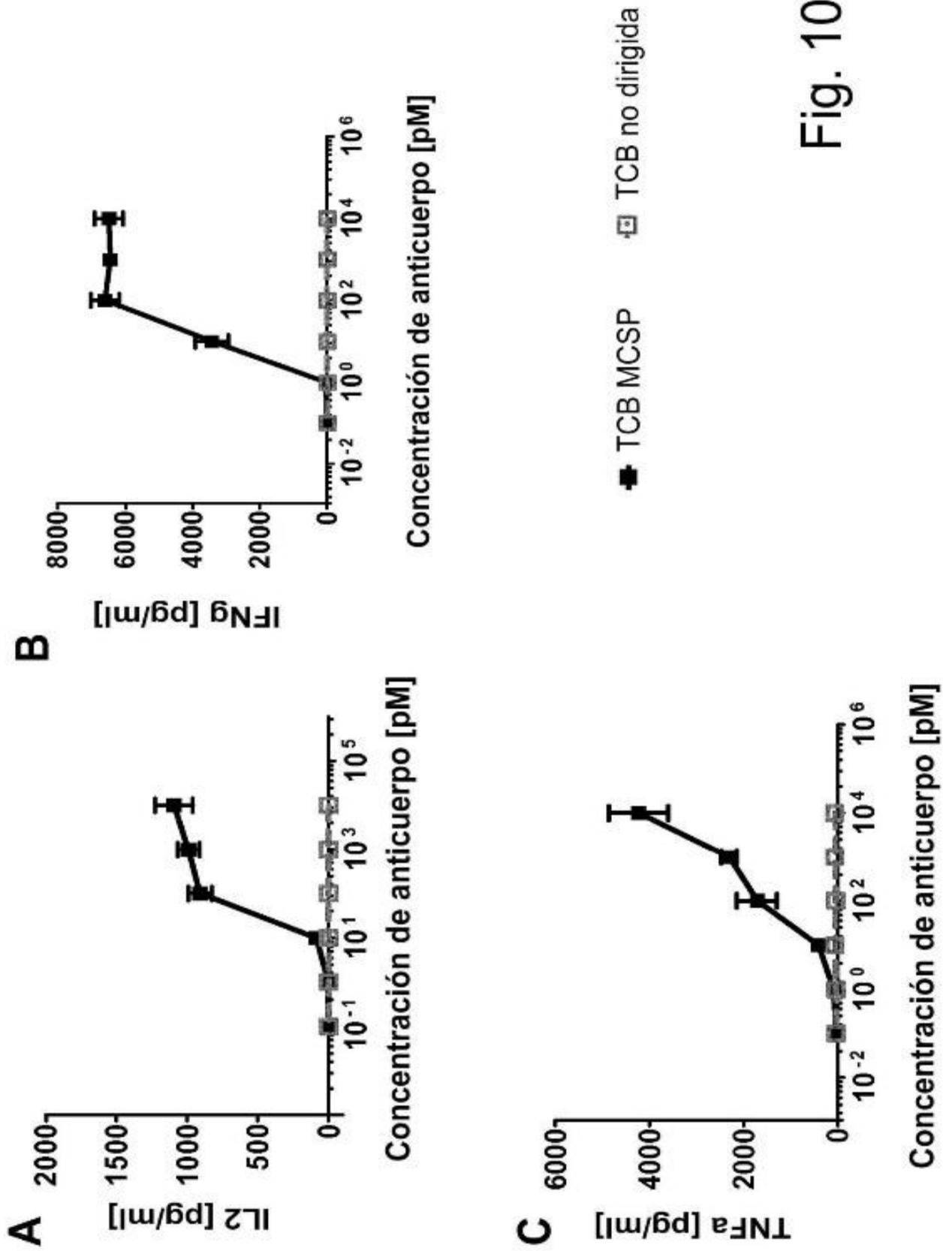


Fig. 10

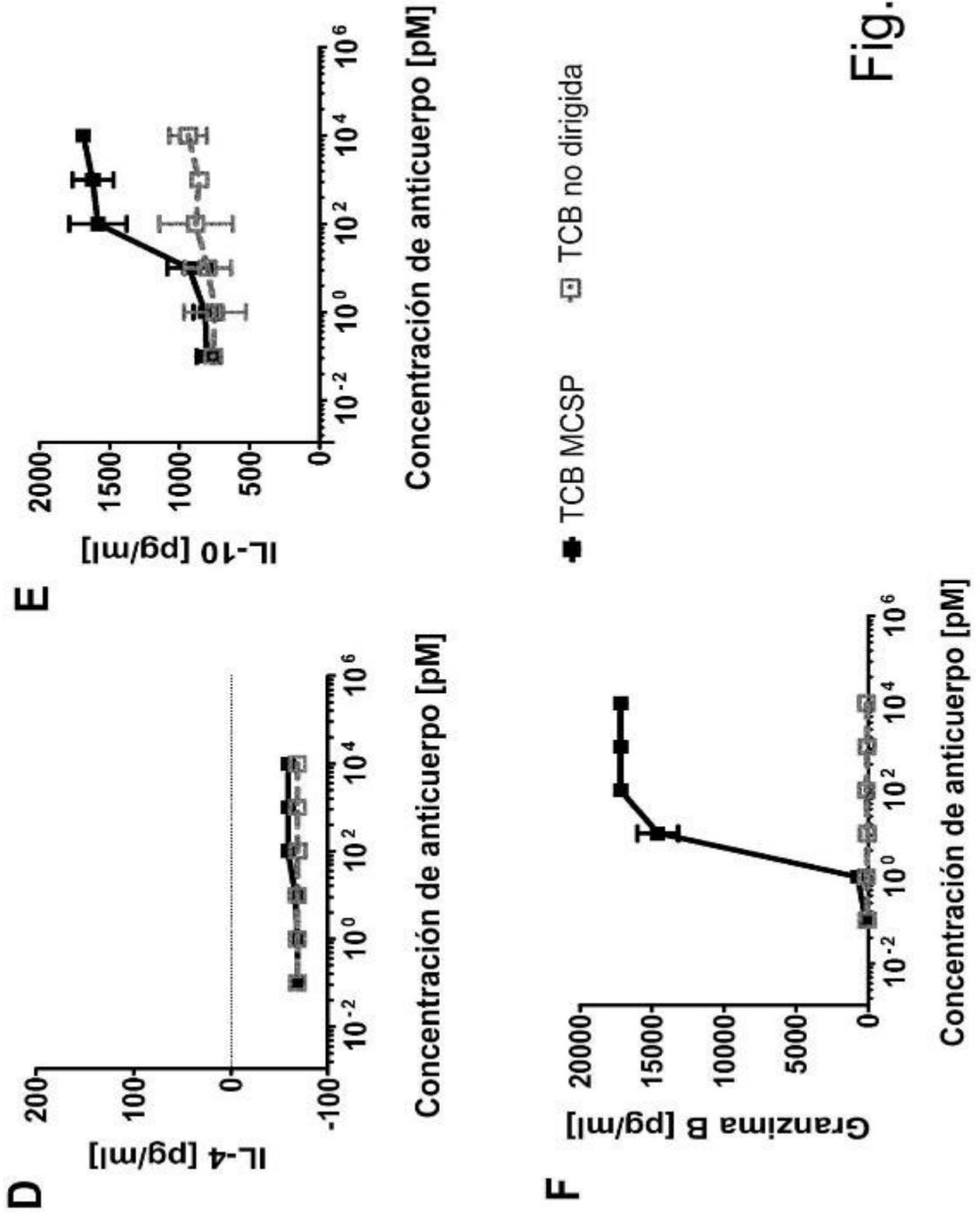


Fig. 10

Fig. 11

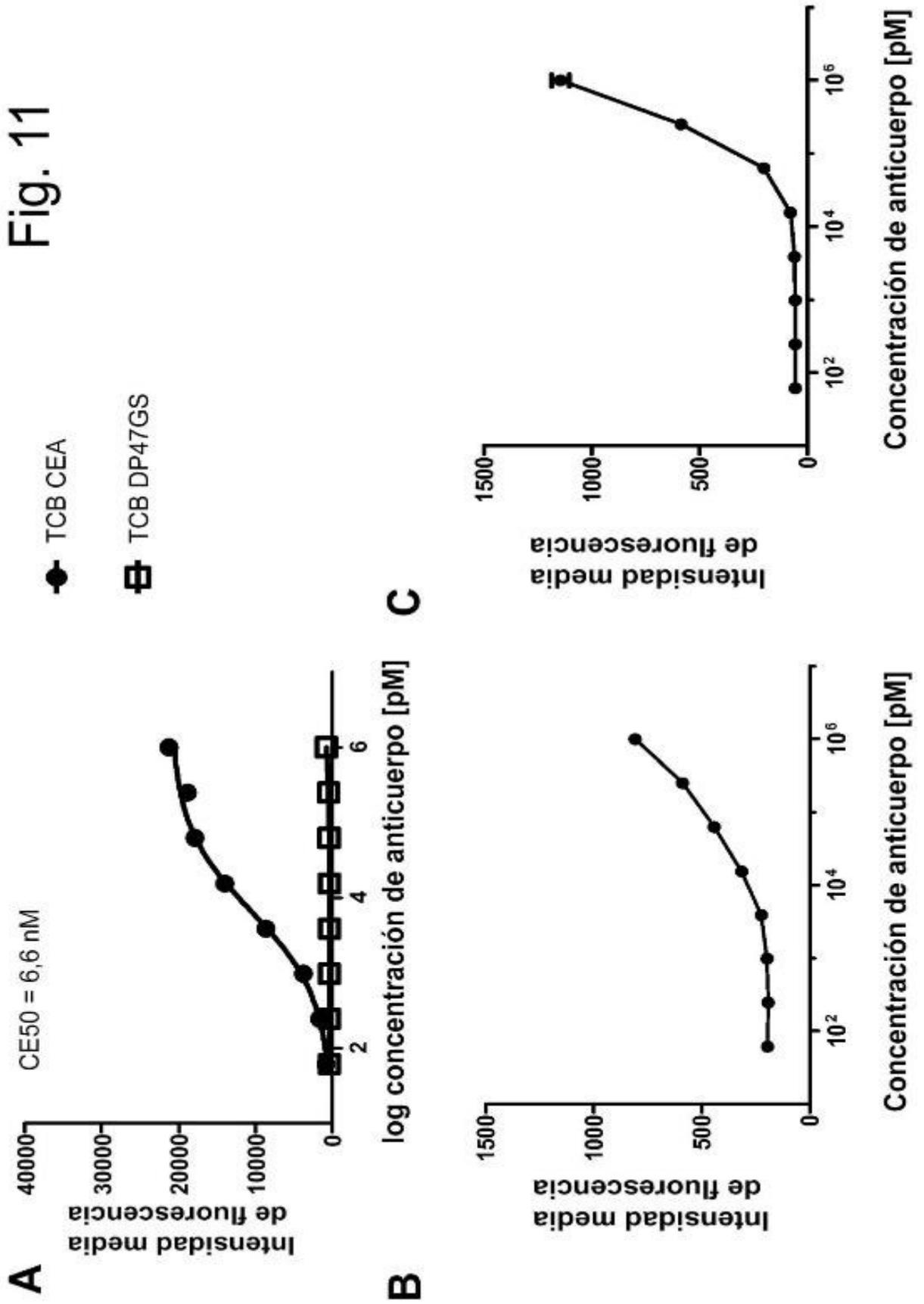


Fig. 12

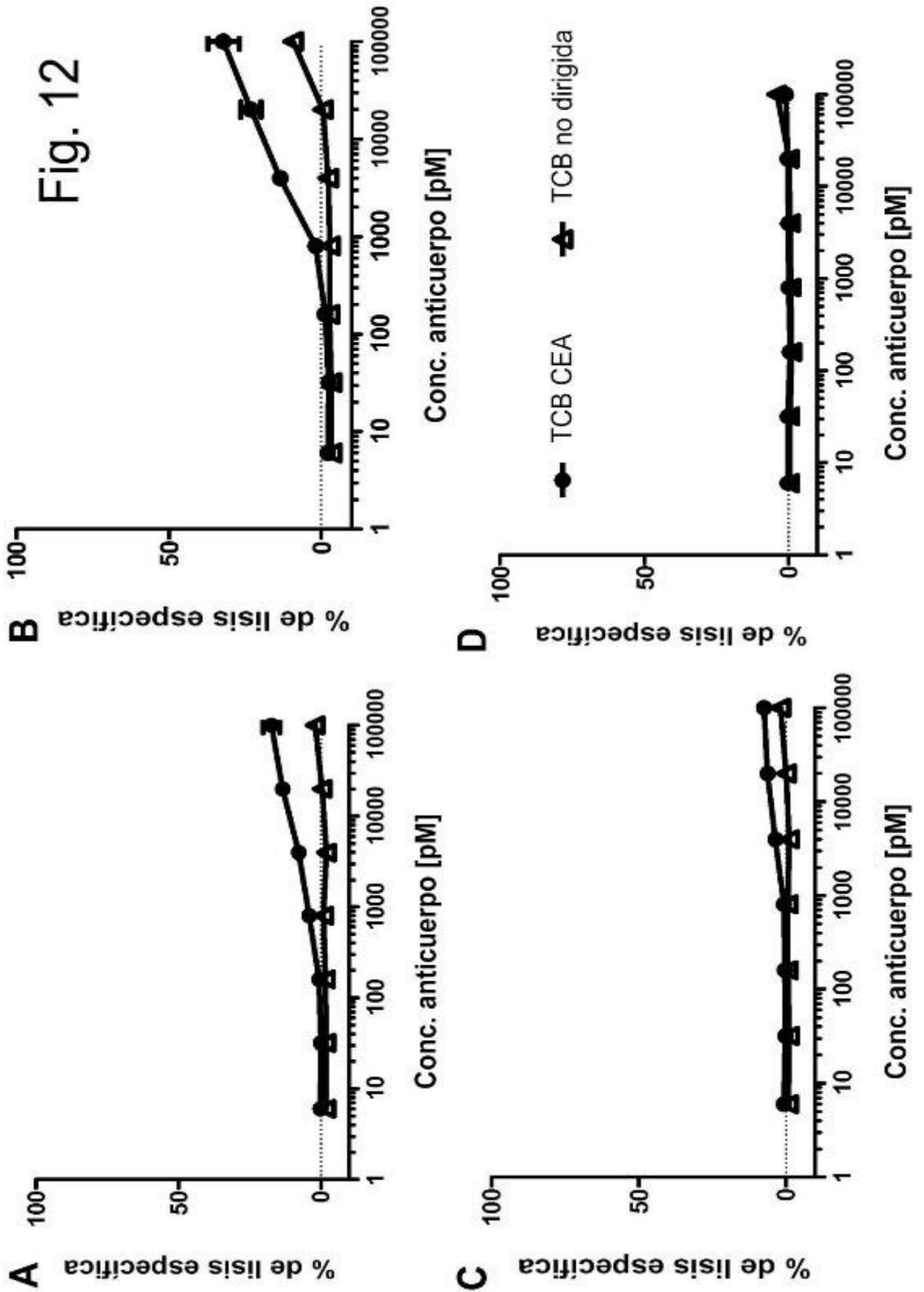
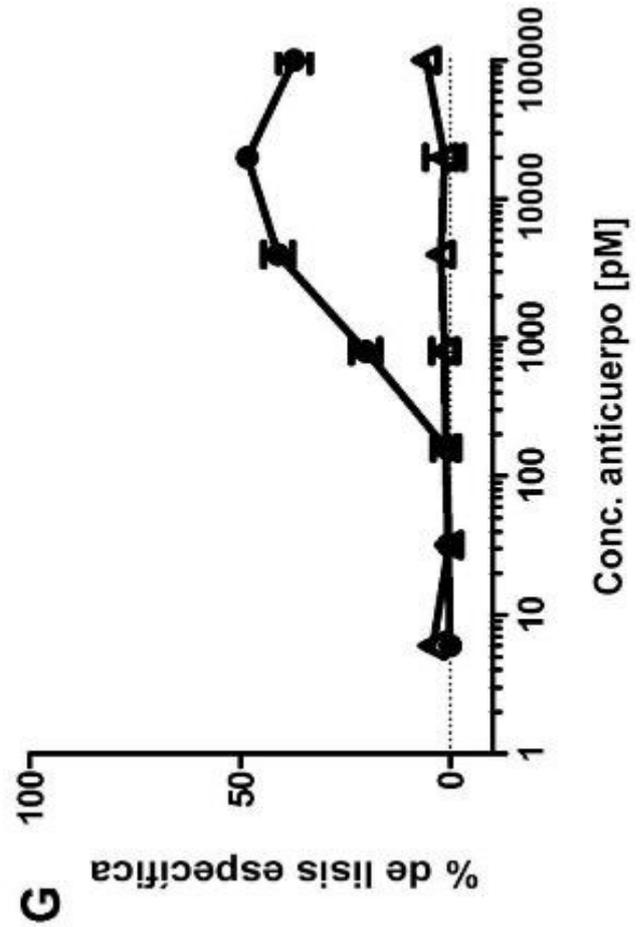
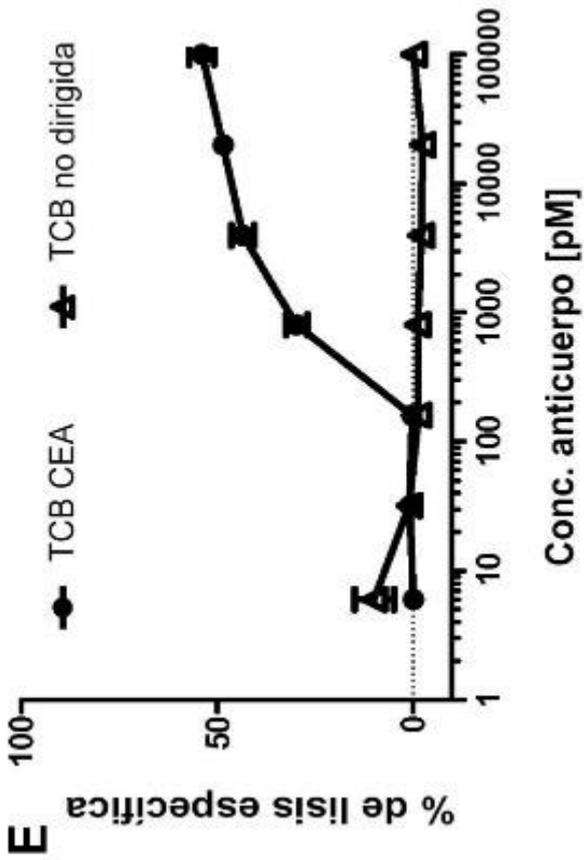
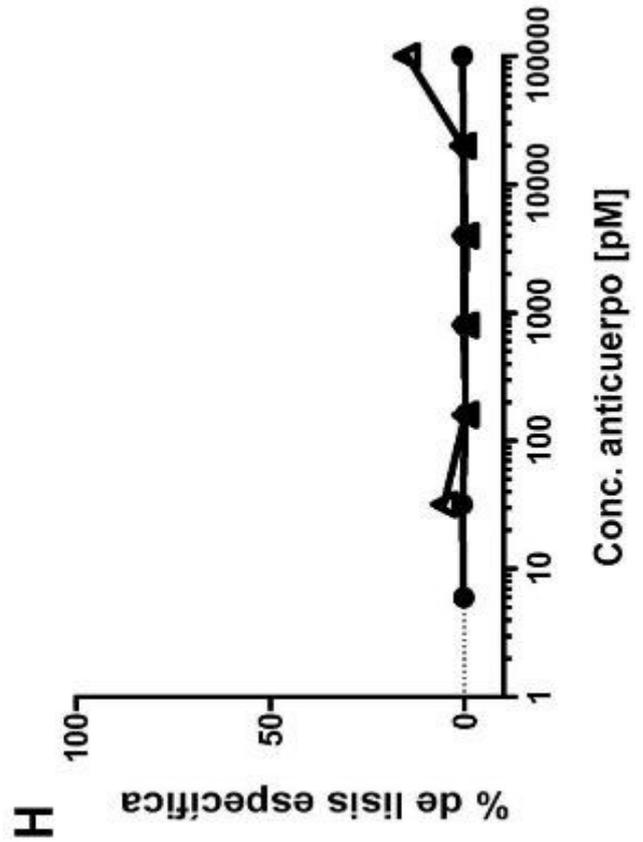
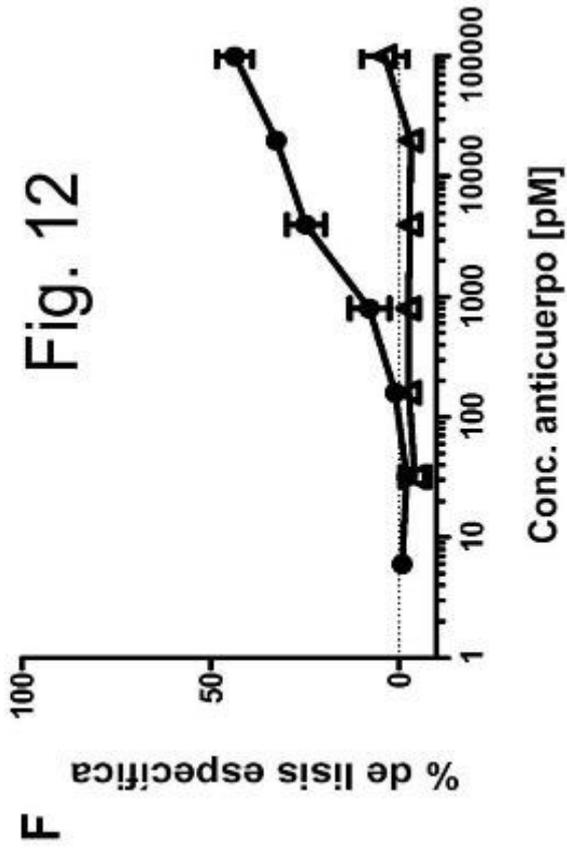


Fig. 12



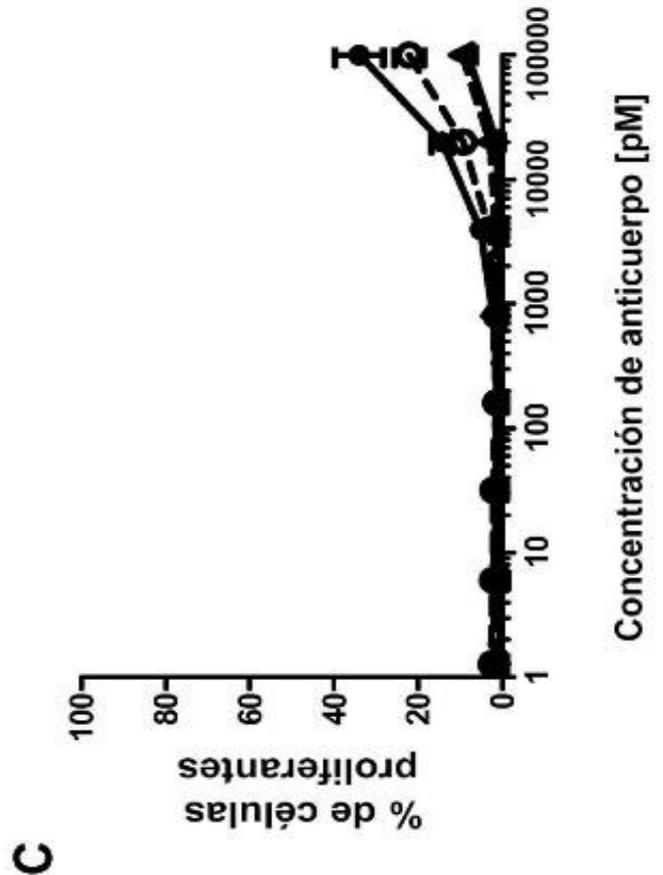
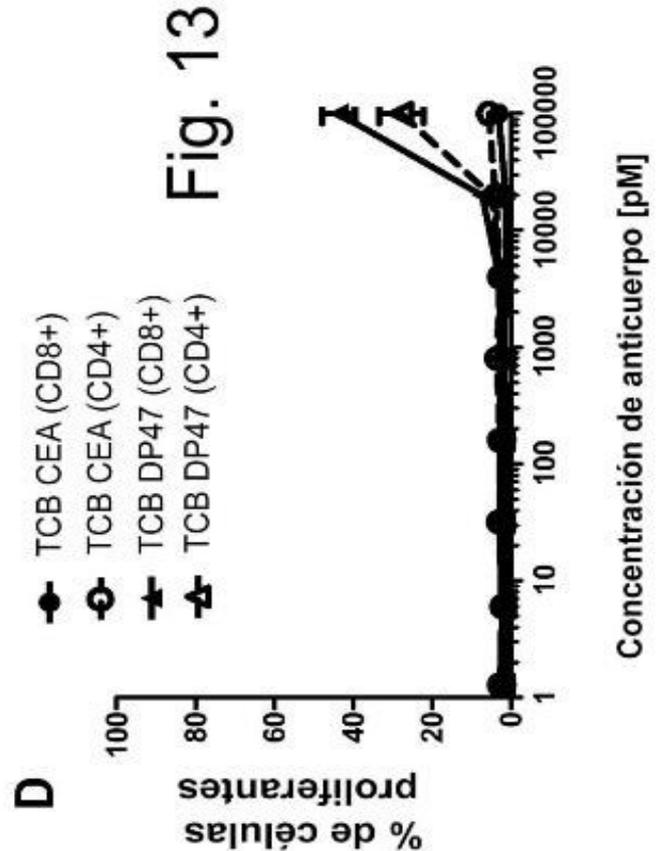
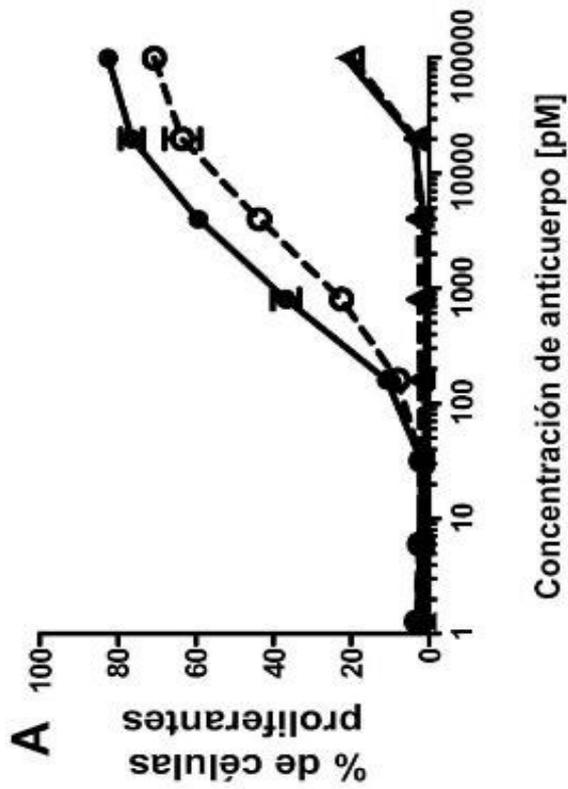
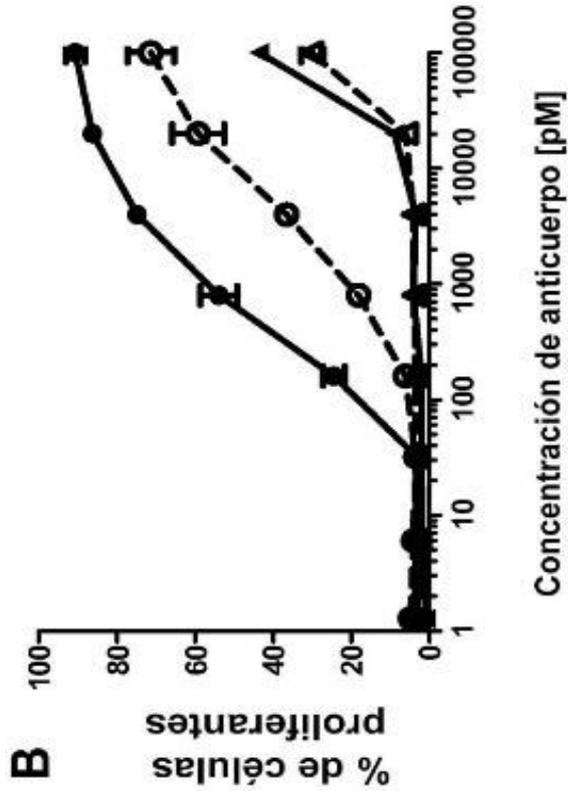
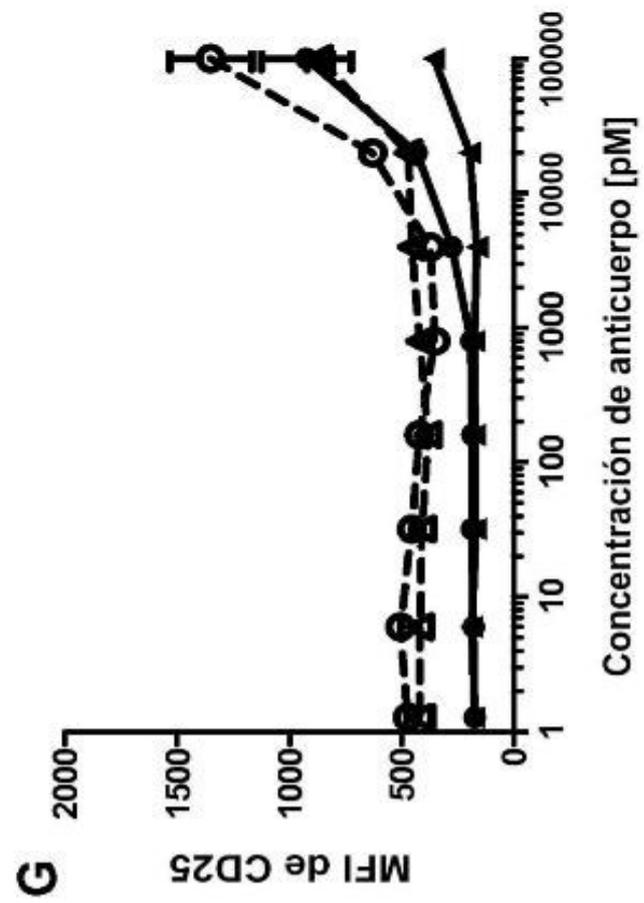
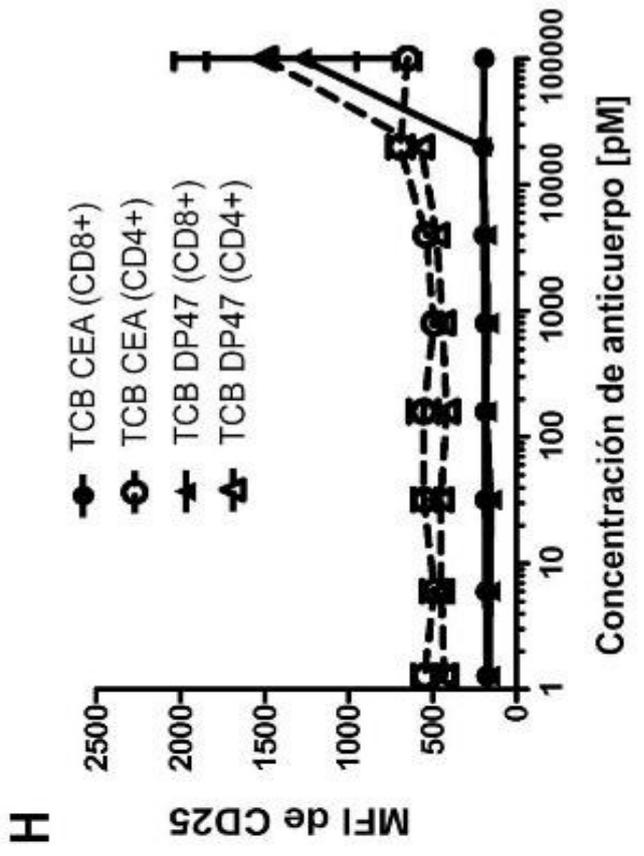
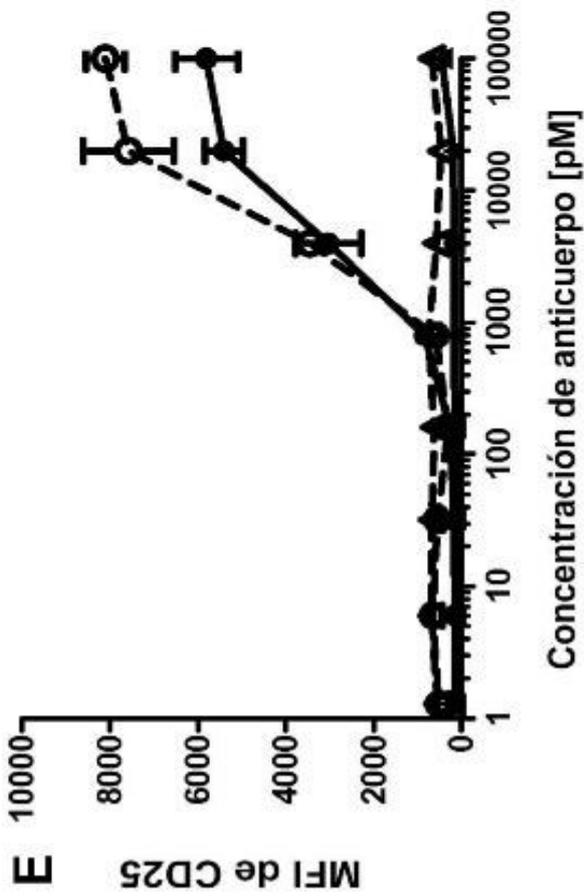
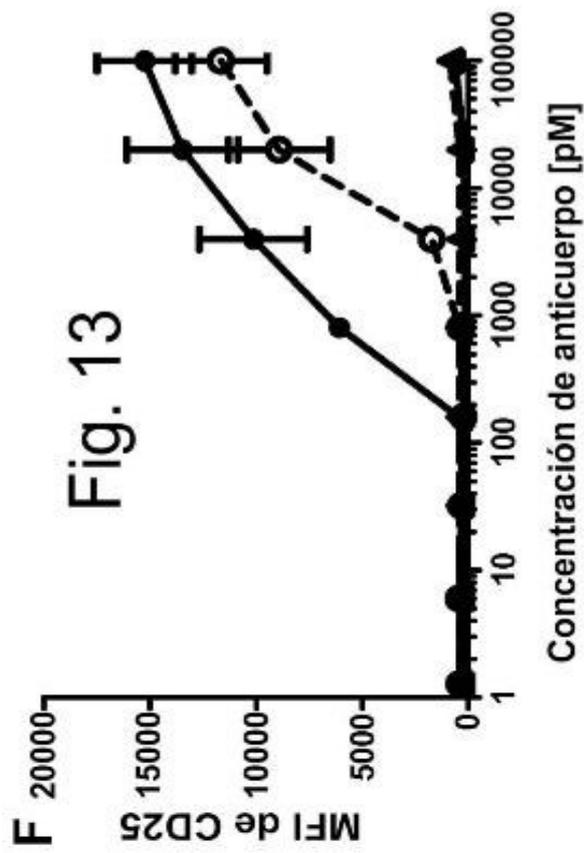


Fig. 13

Fig. 13



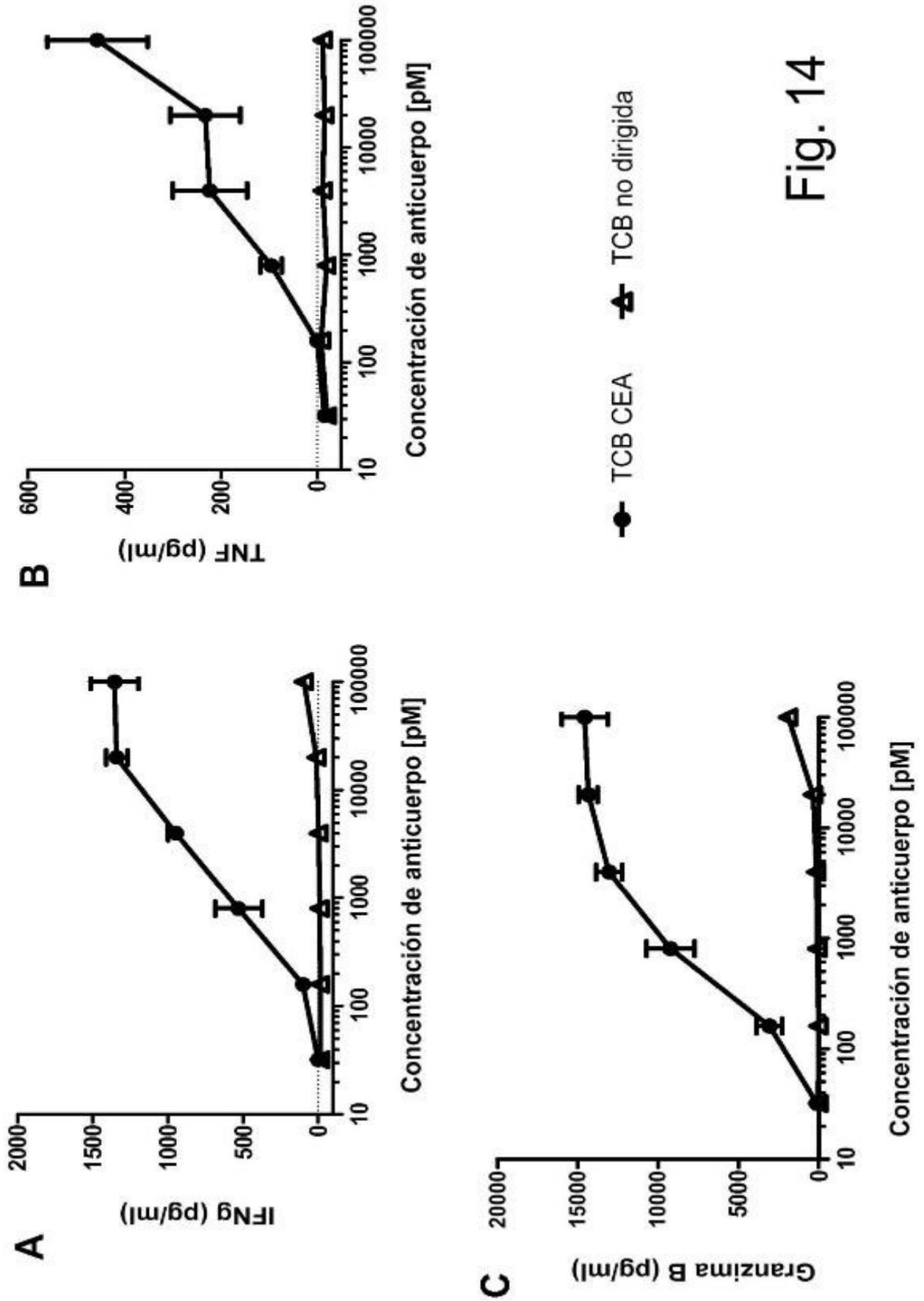
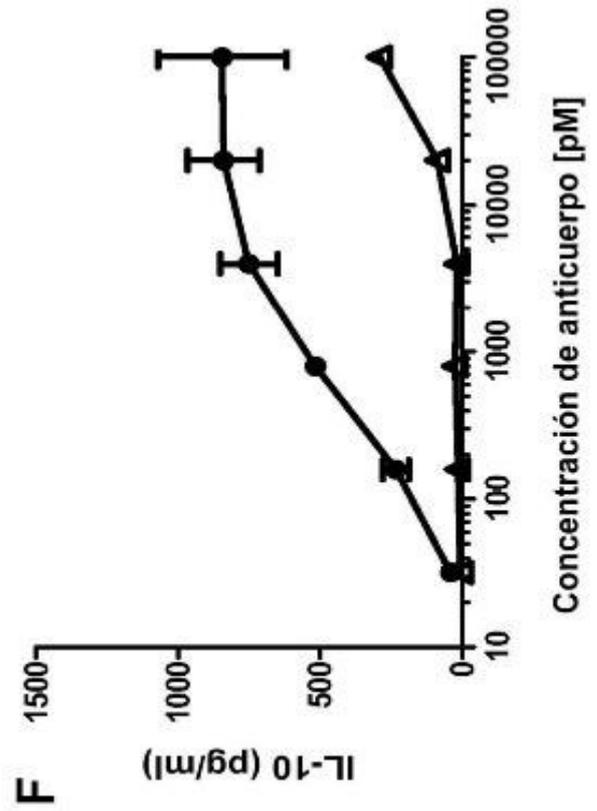
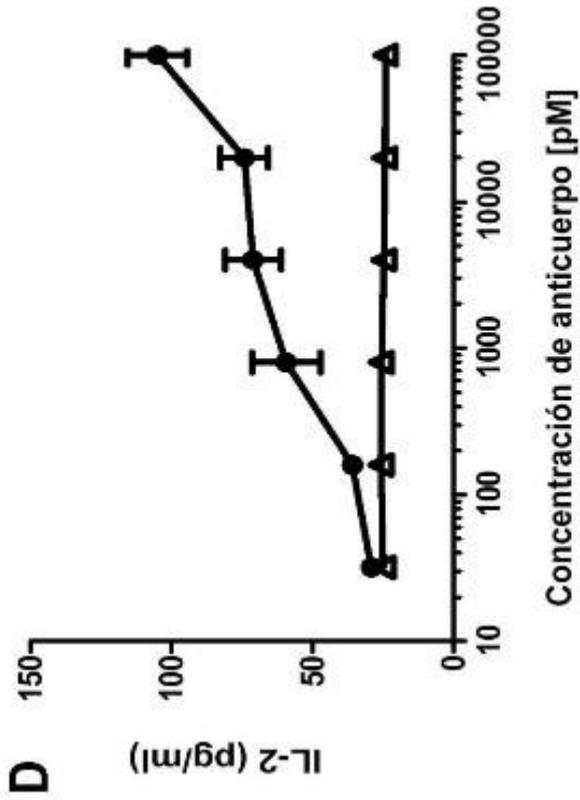
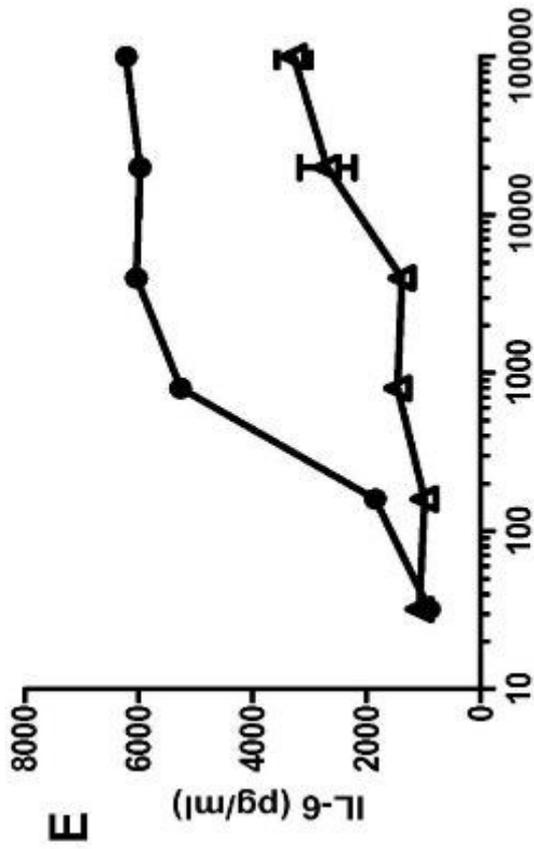


Fig. 14



● TCB CEA ▲ TCB no dirigida

Fig. 14

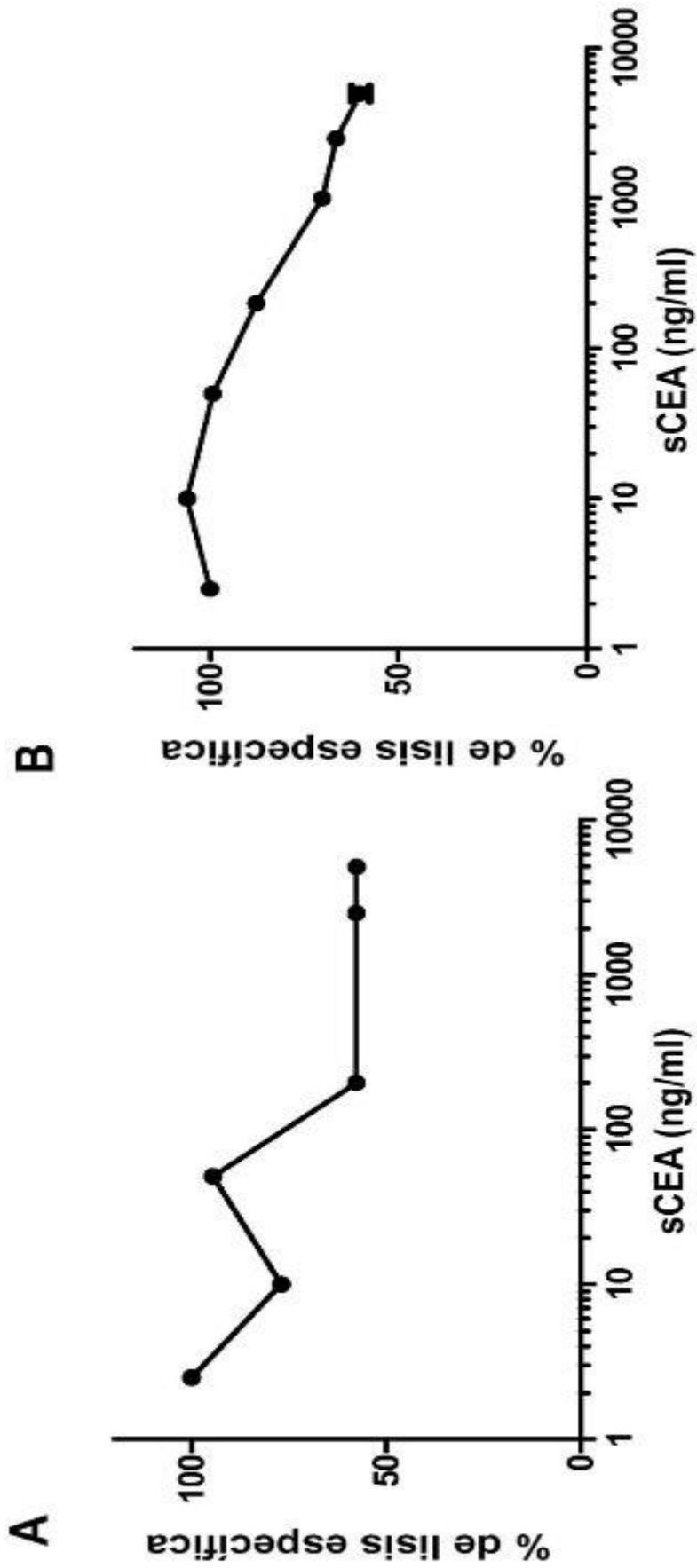
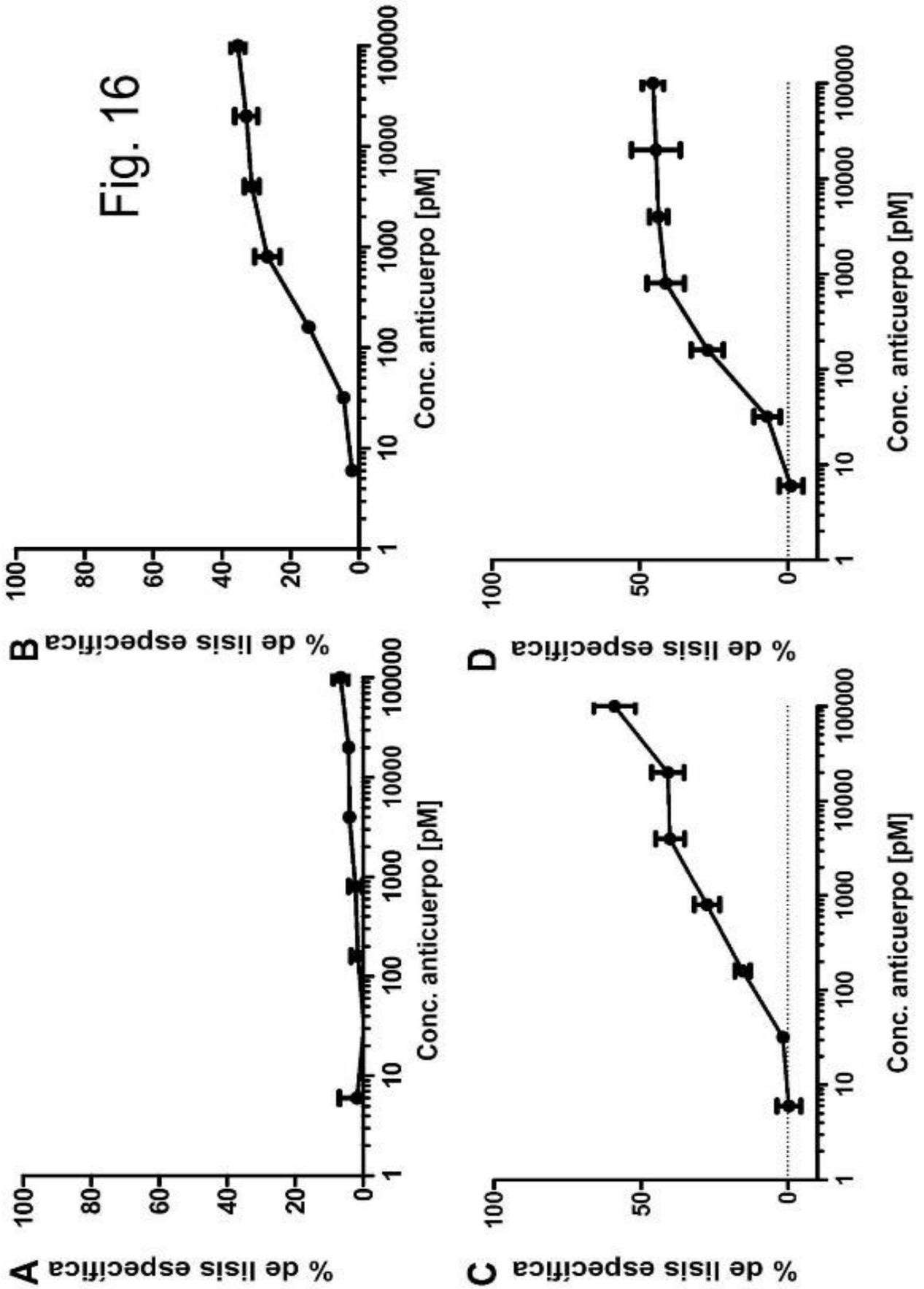


Fig. 15

Fig. 16



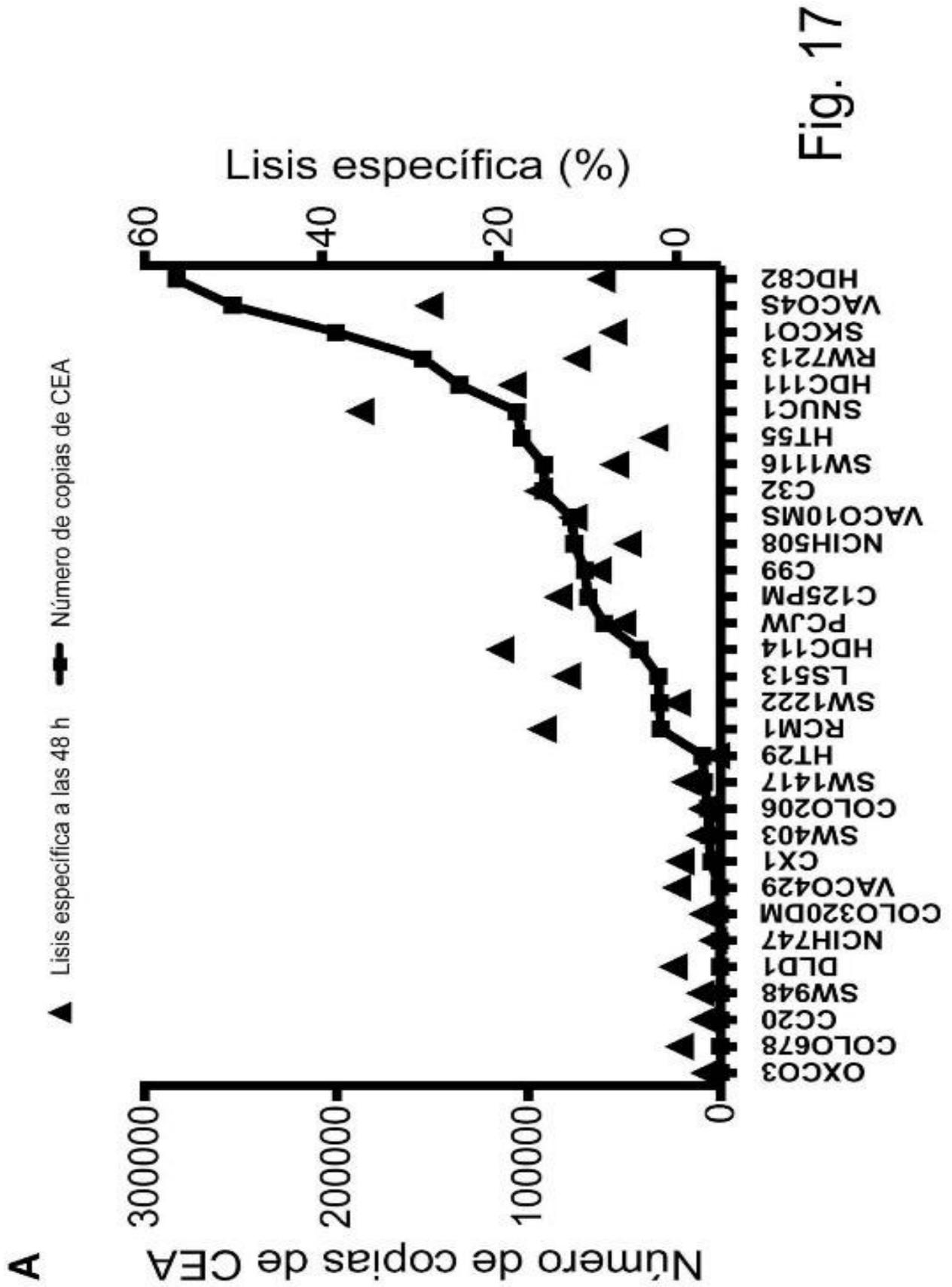


Fig. 17

C

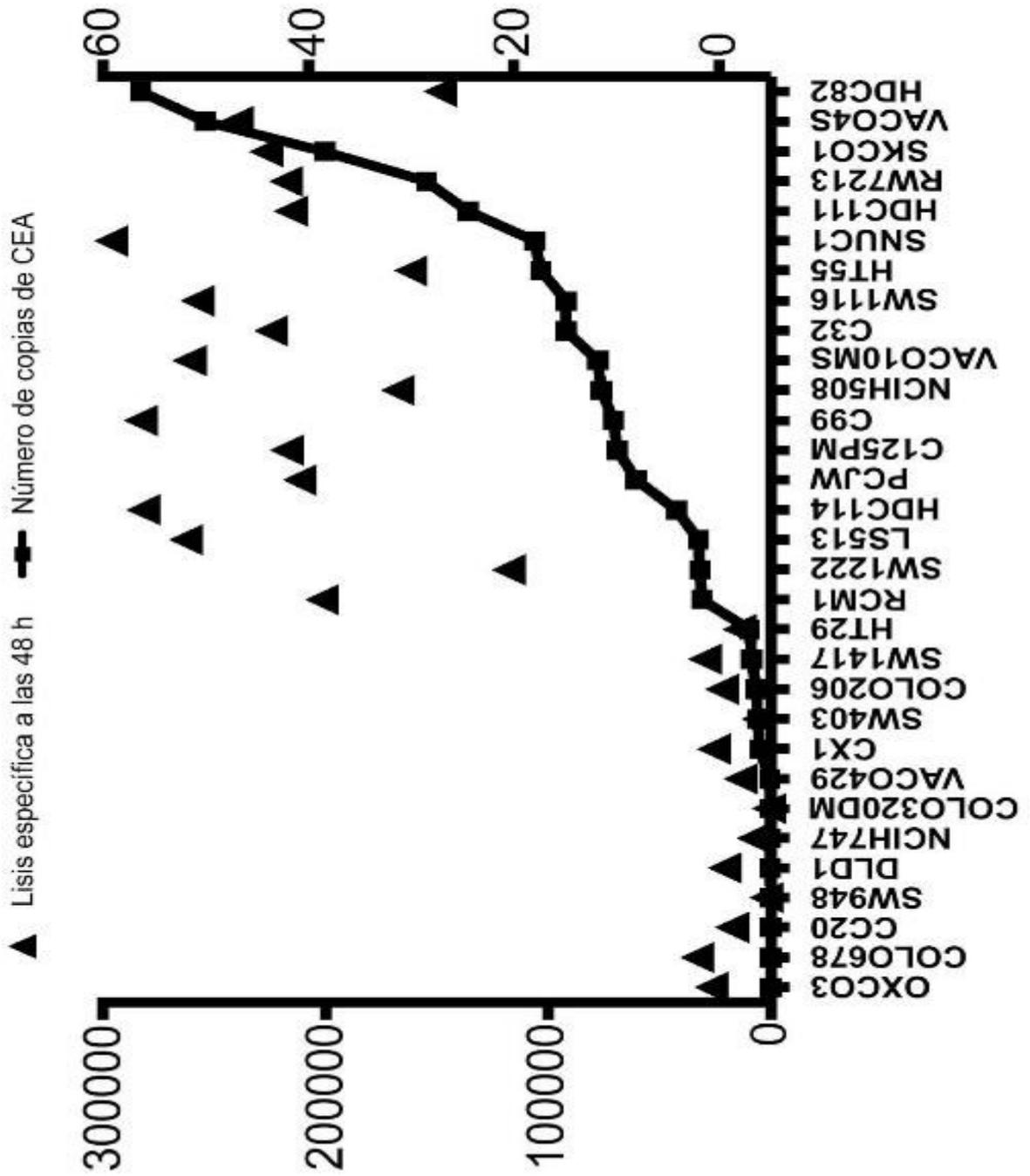


Fig. 17

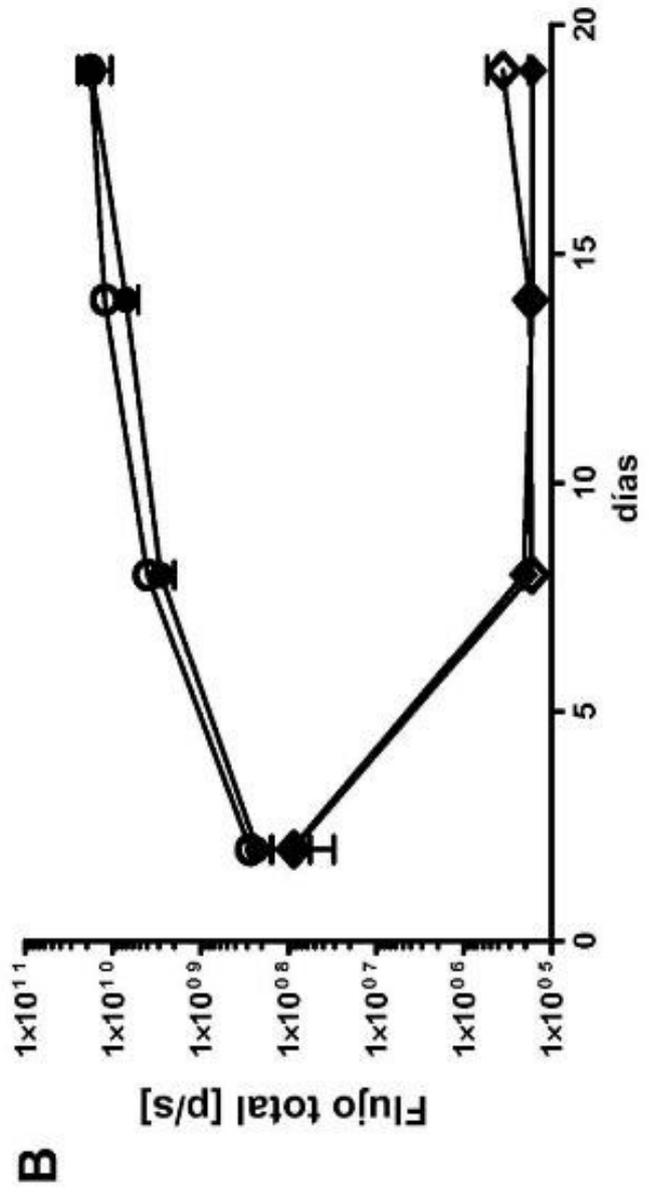
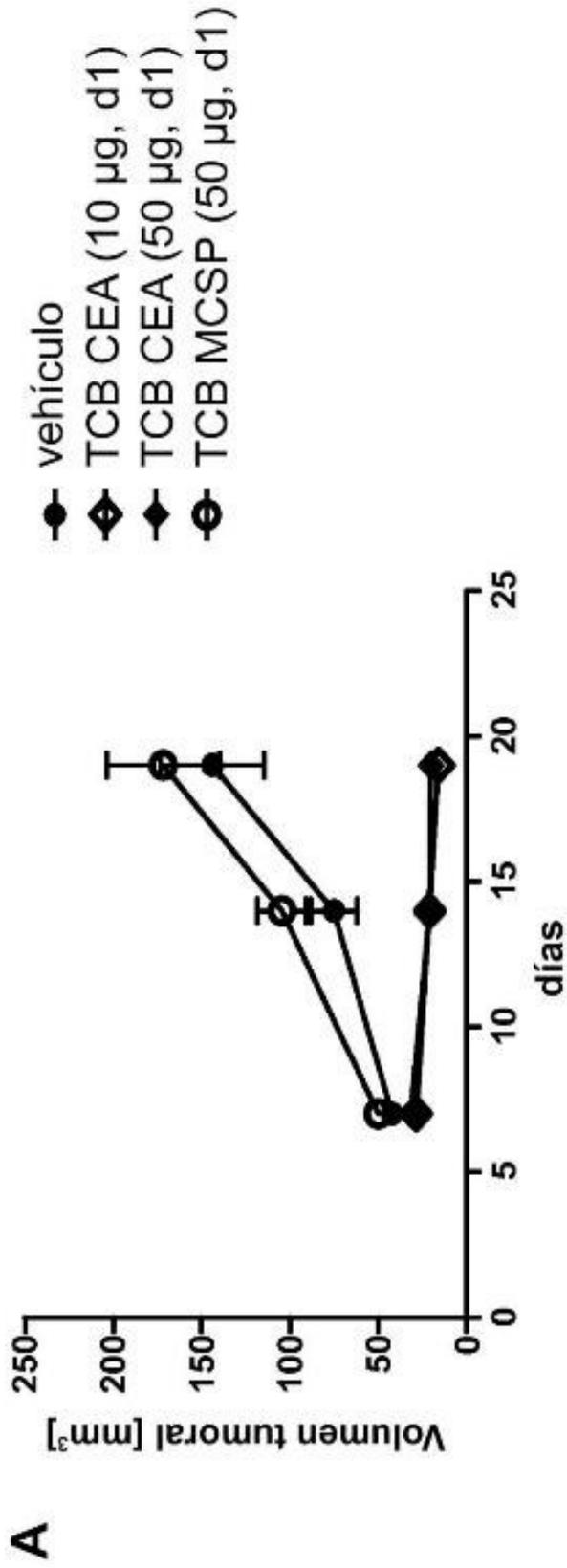


Fig. 18

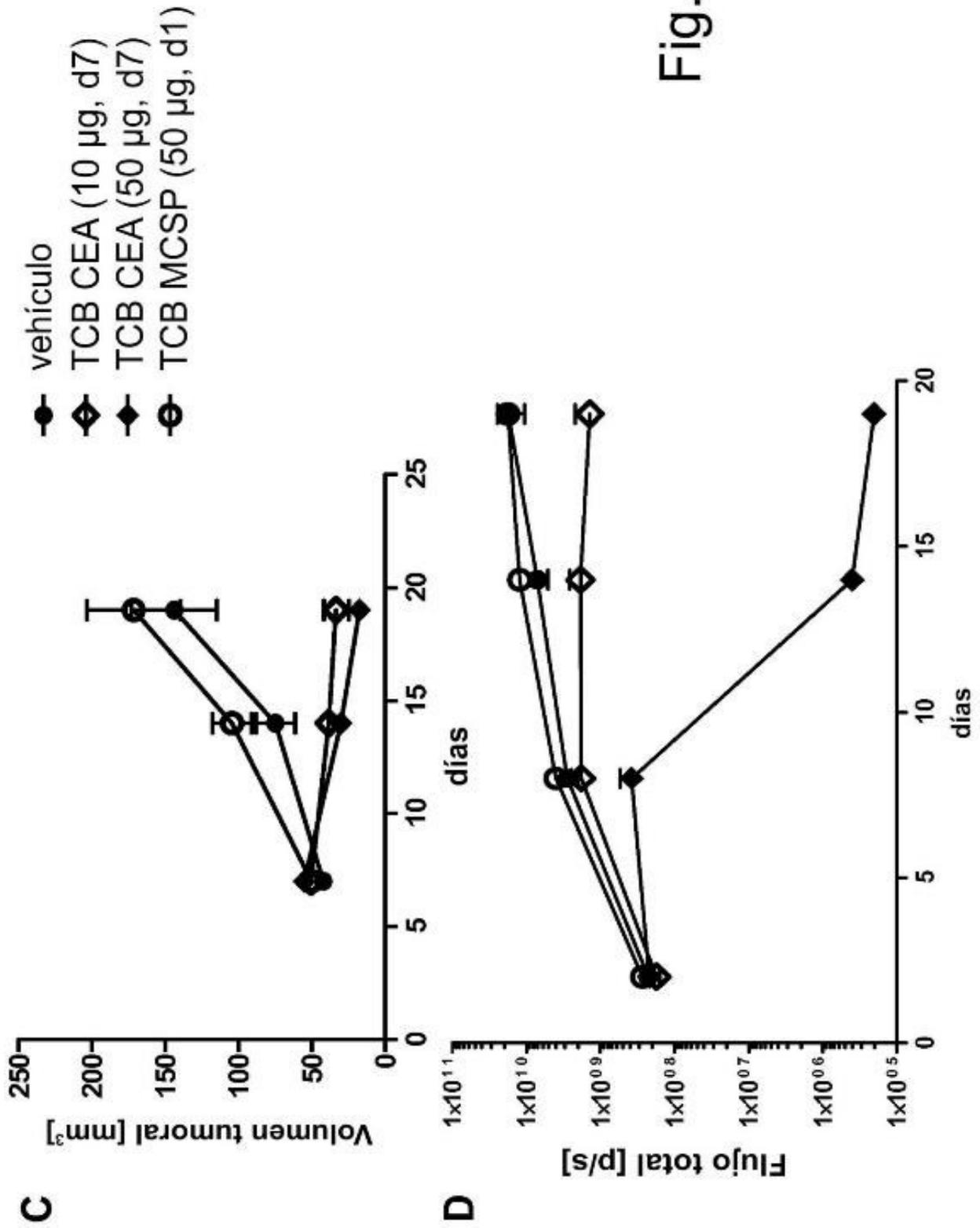


Fig. 18

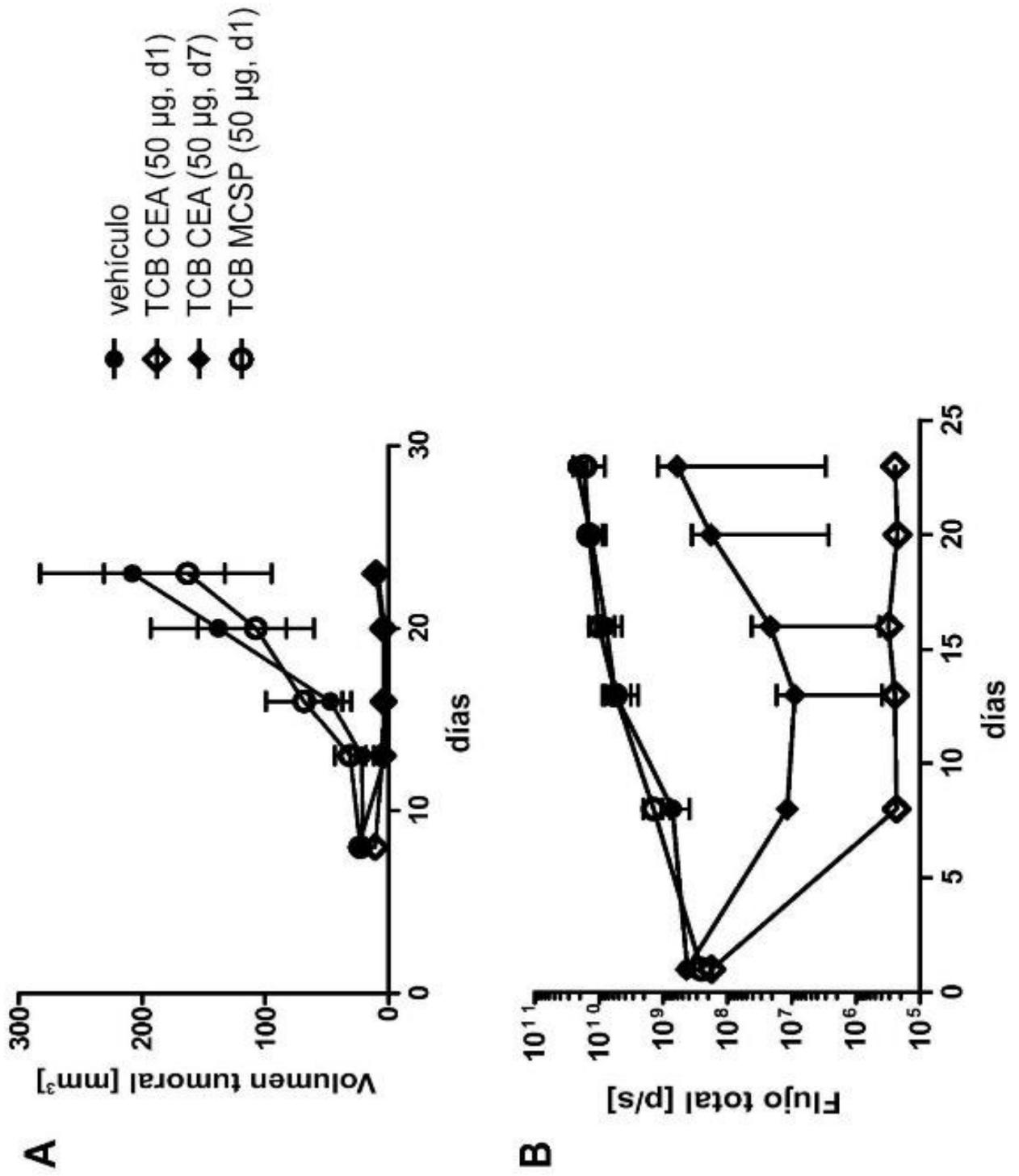
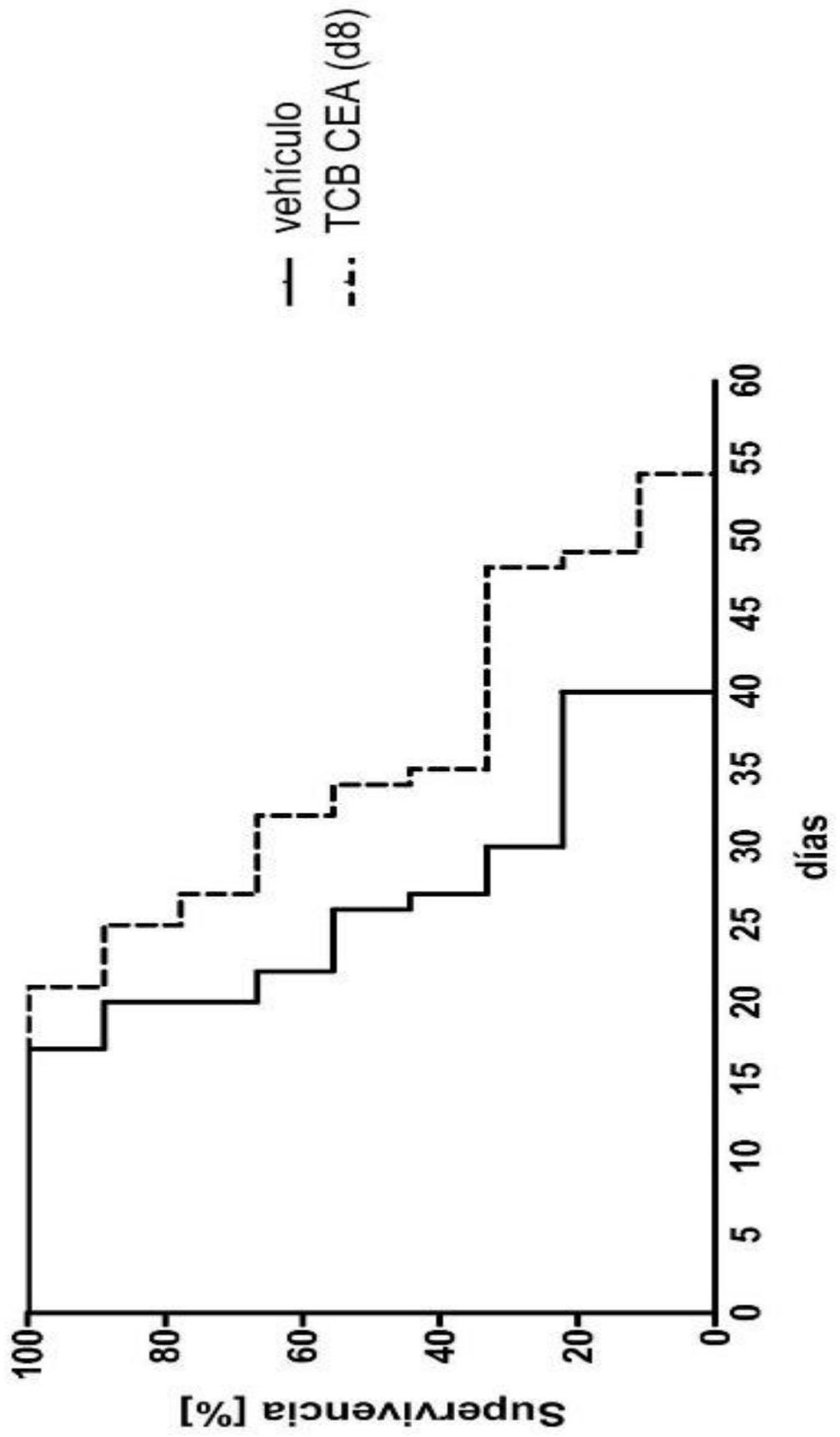


Fig. 19

Fig. 20



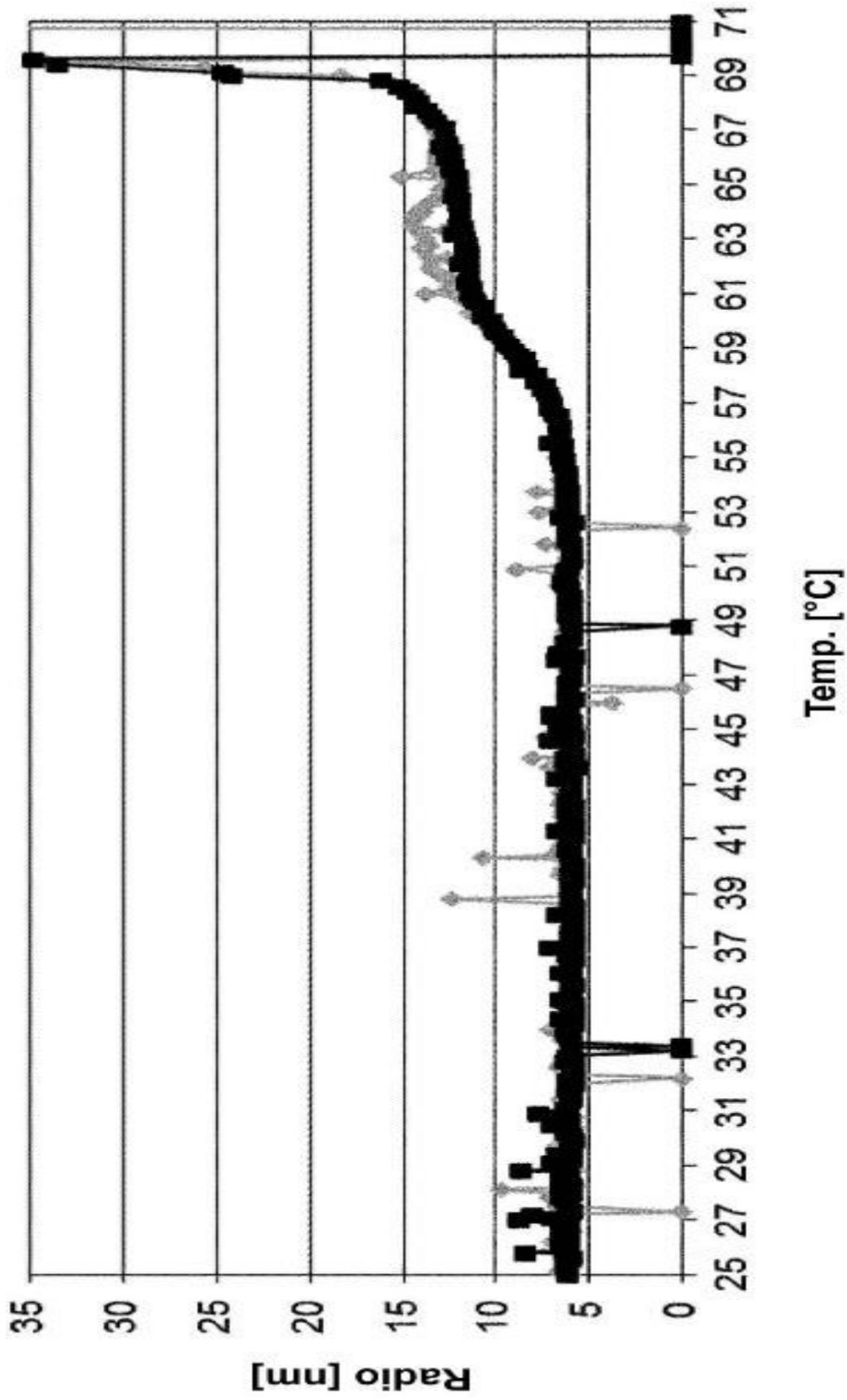


Fig. 21

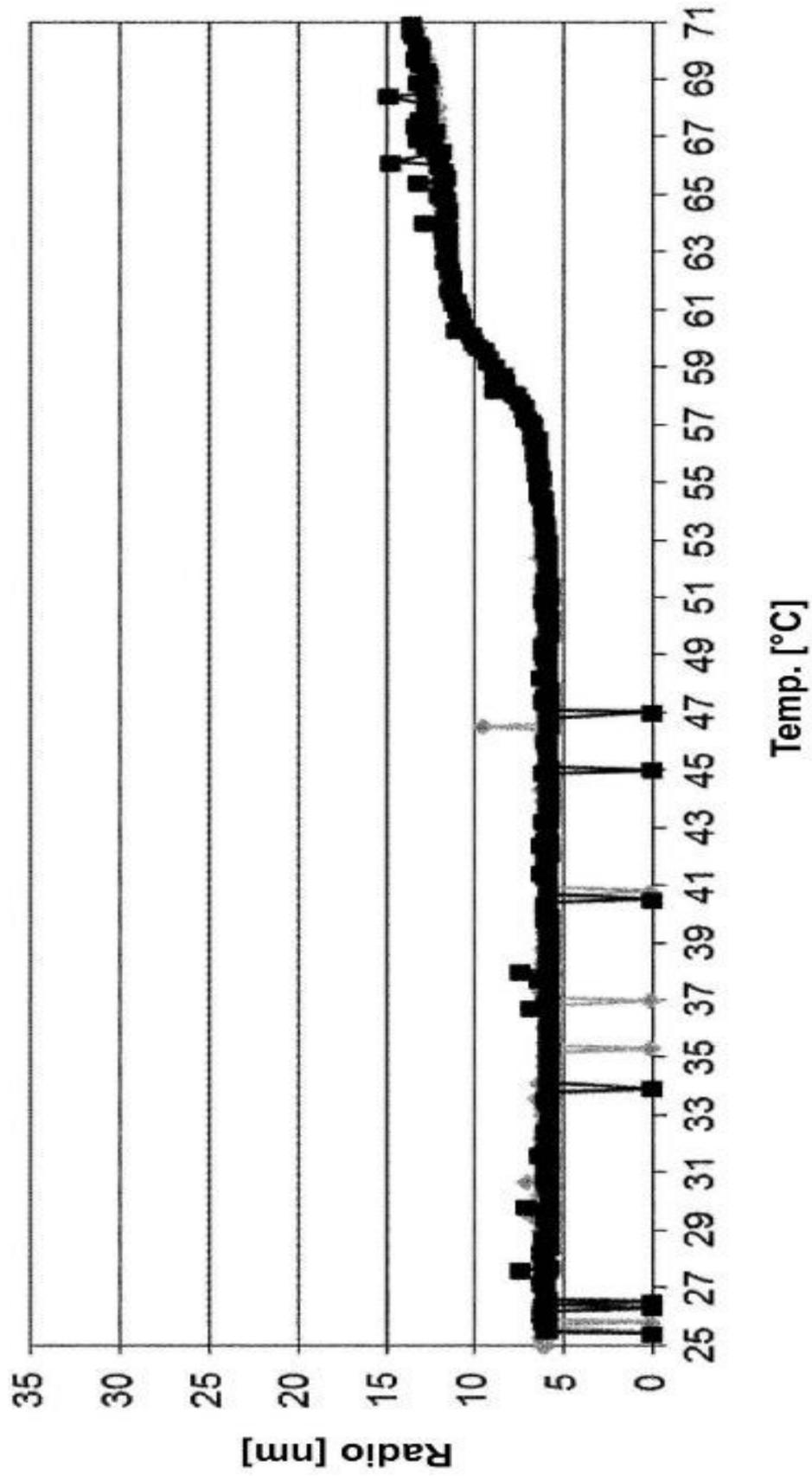


Fig. 22

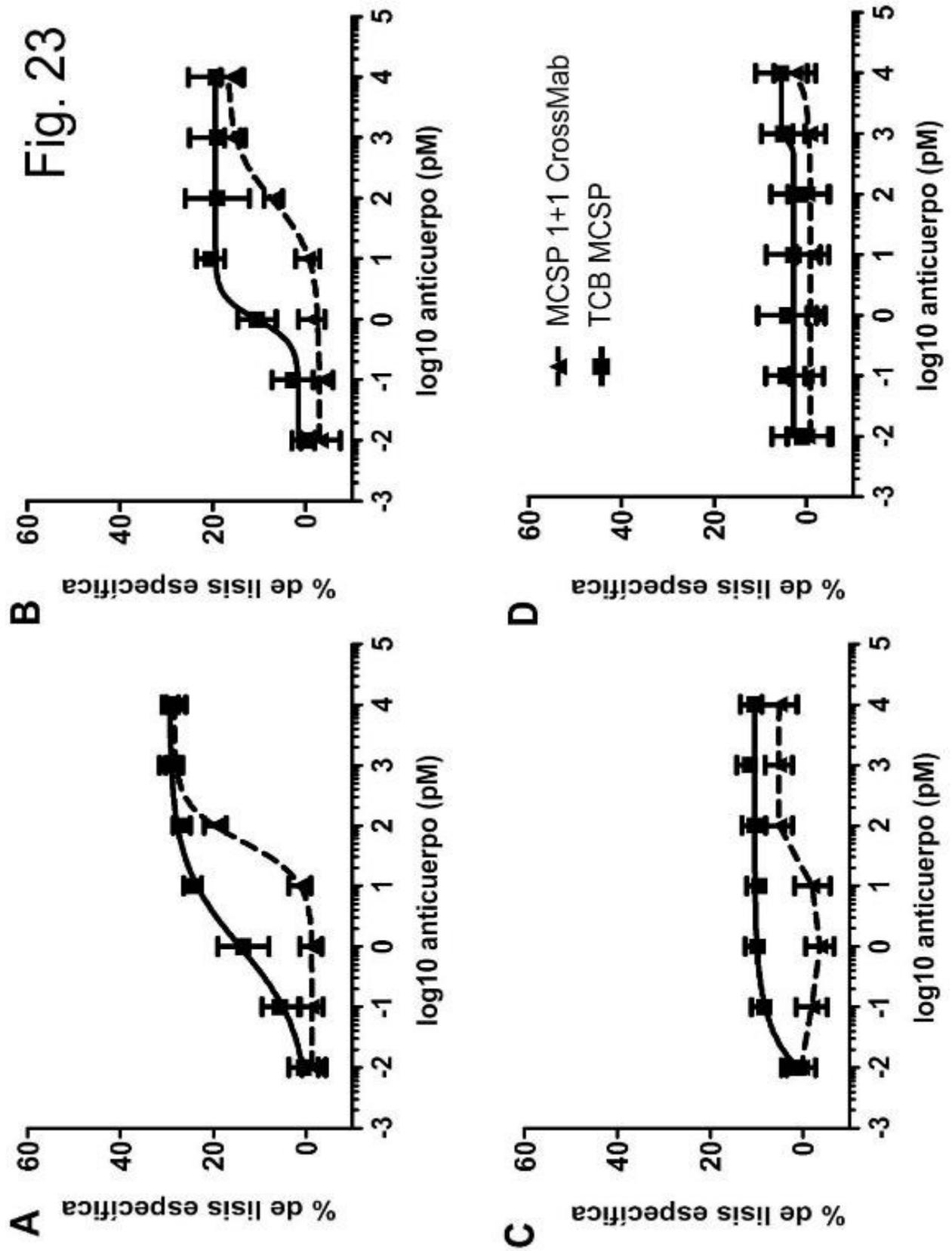
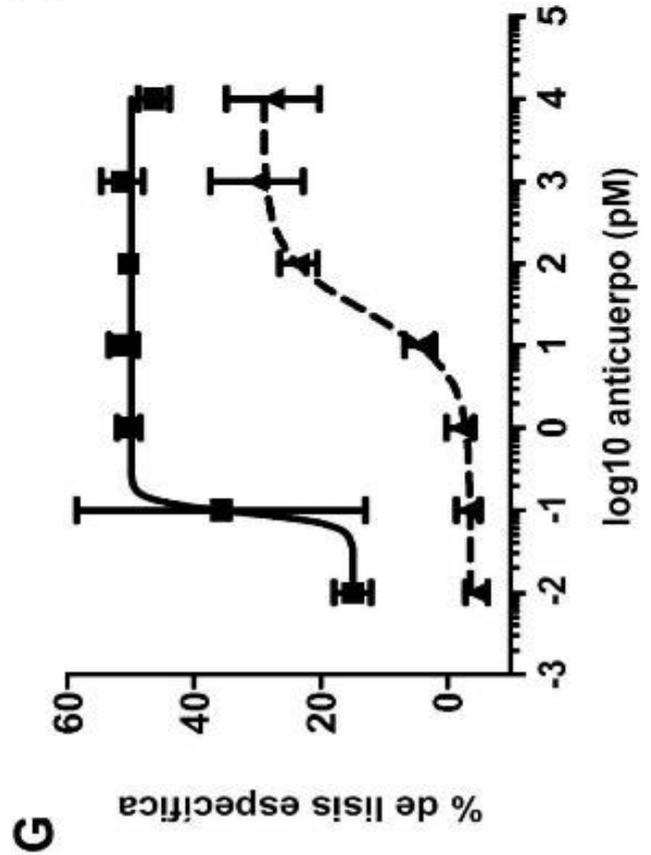
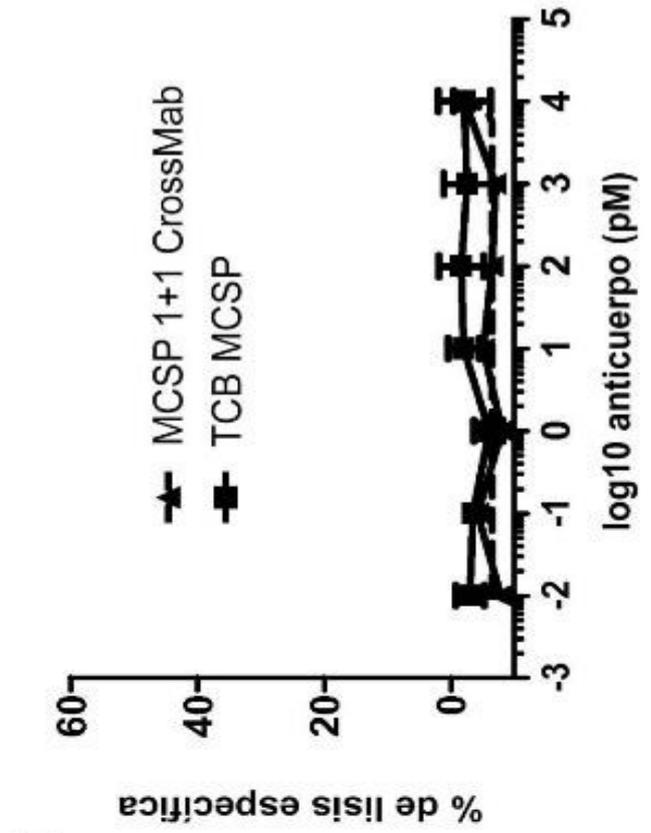
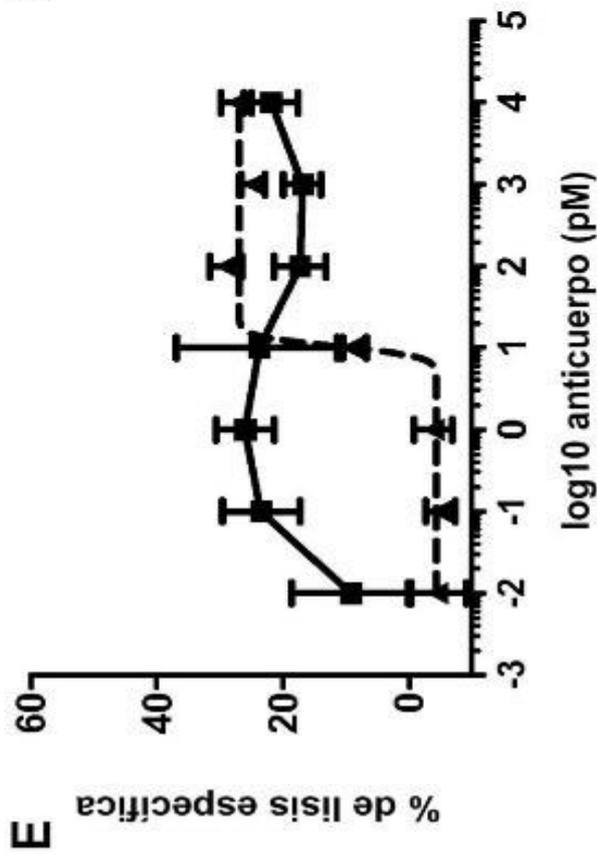
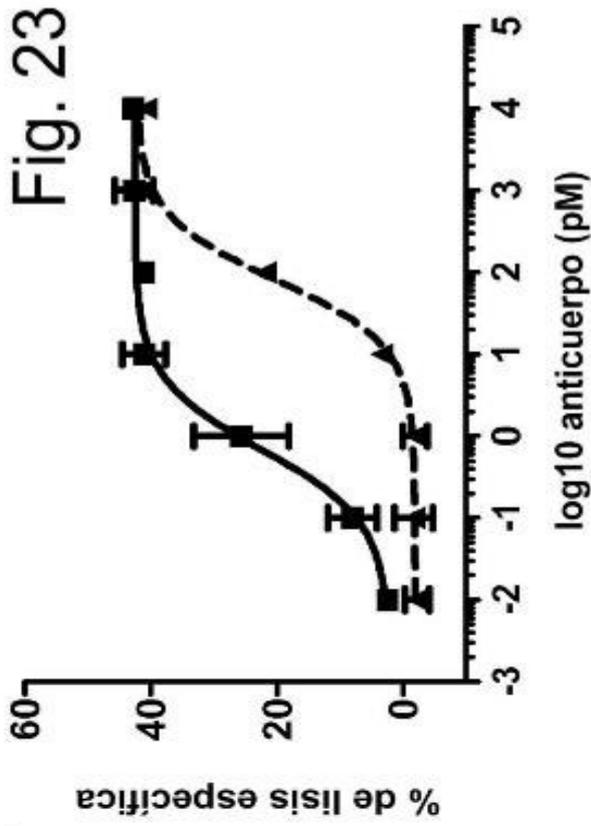


Fig. 23



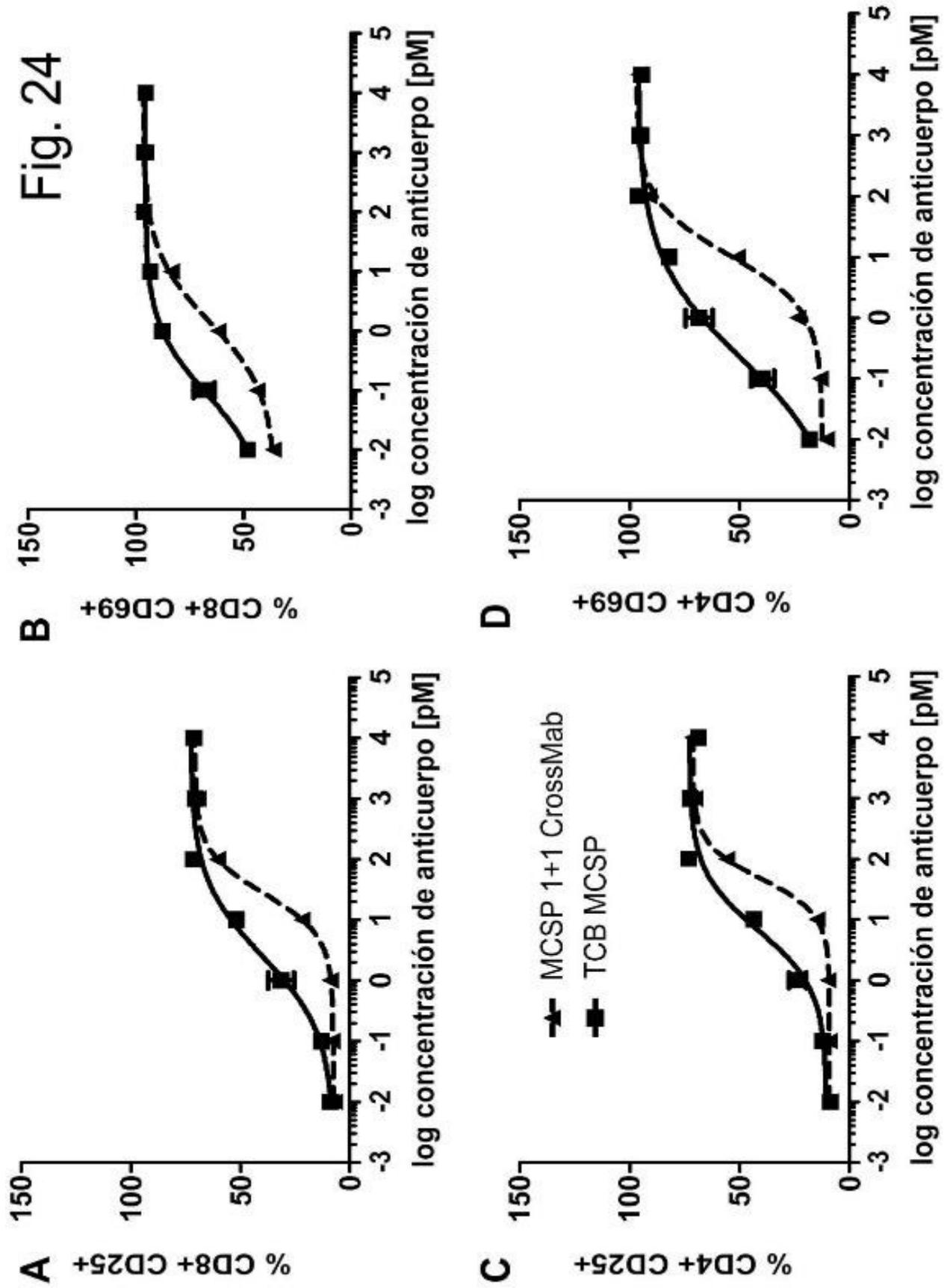
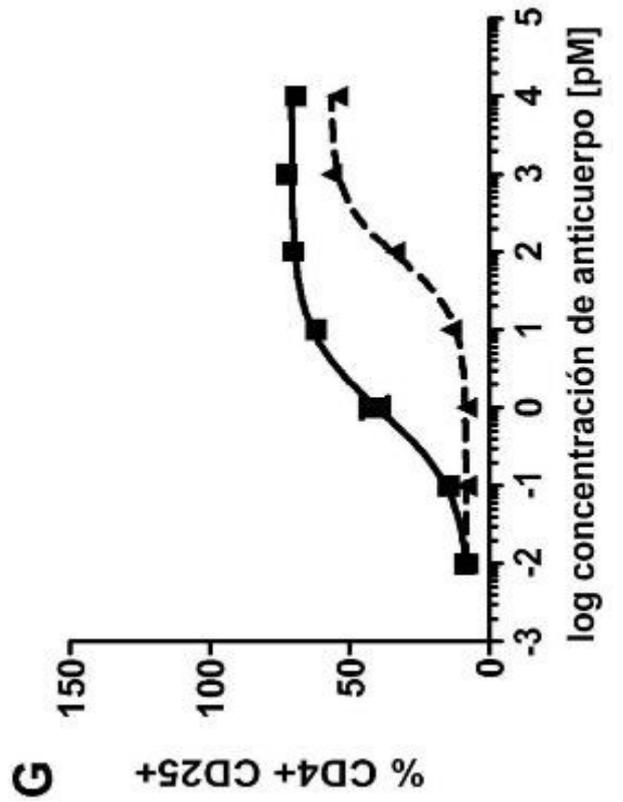
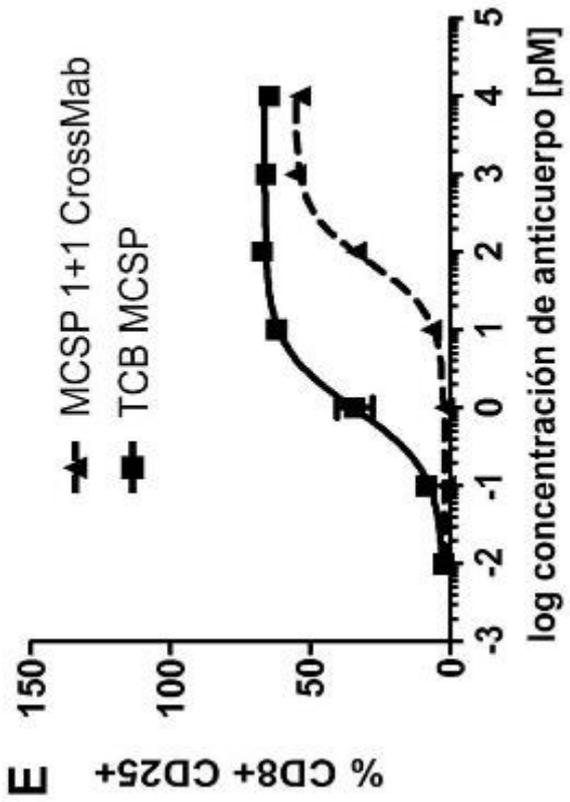
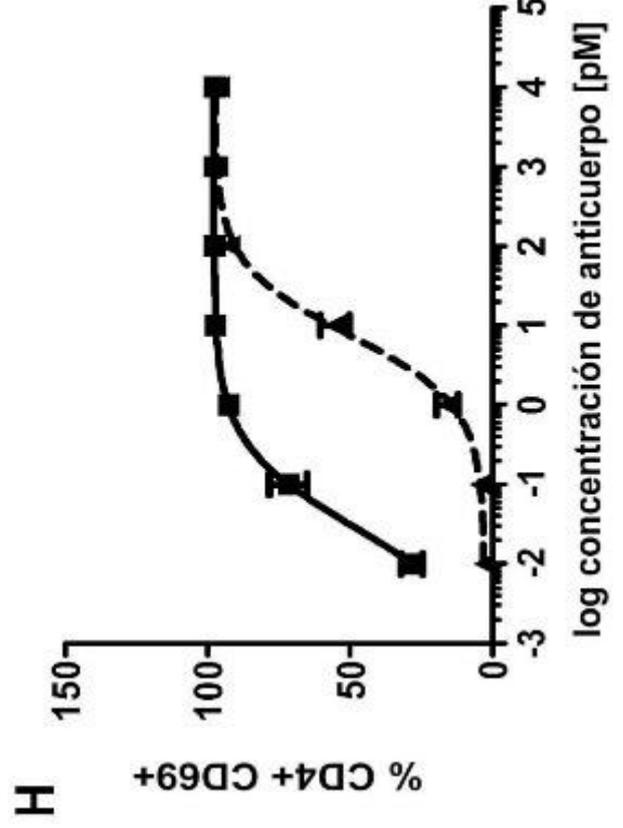
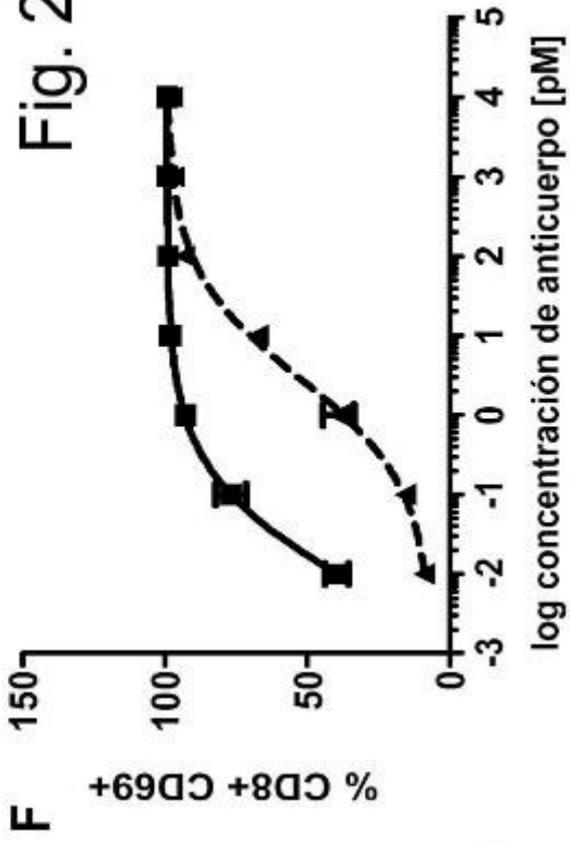


Fig. 24



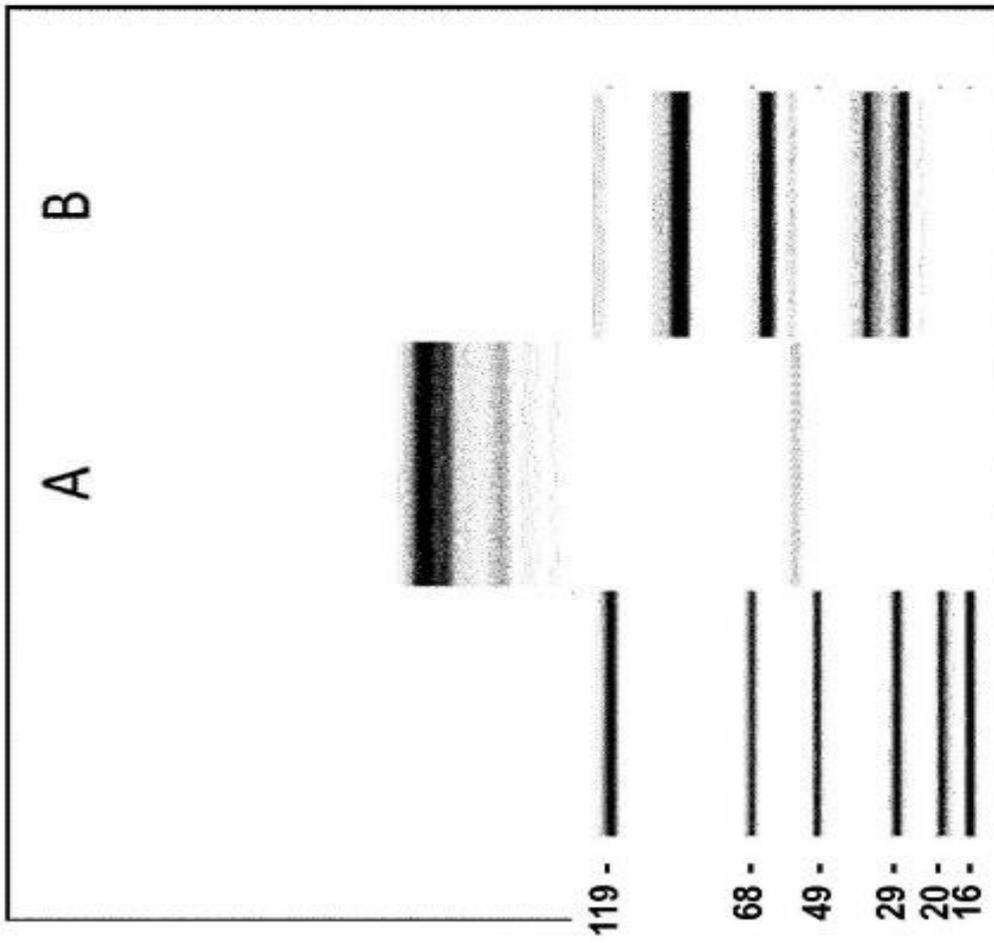


Fig. 25