(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 776 706**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/EP2014/064326**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001085**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14737200 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3016681**

(54) Título: **Anticuerpos contra CD3 humanizados o quiméricos**

(30) Prioridad:

05.07.2013 WO PCT/EP2013/064330
09.01.2014 WO PCT/EP2014/050340
09.01.2014 DK 201400009

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2020

(73) Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)
Kalvebod Brygge 43
1560 Copenhagen V, DK

(72) Inventor/es:

VAN DEN BRINK, EDWARD;
NEIJSSEN, JOOST J.;
LABRIJN, ARAN FRANK;
MEESTERS, JOYCE;
SCHUURMAN, JANINE y
PARREN, PAUL

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 776 706 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra CD3 humanizados o quiméricos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado que se une a CD3 humano, composiciones que comprenden dicho anticuerpo humanizado y dichos anticuerpos humanizados para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

Antecedentes

El Cúmulo de Diferenciación 3 (CD3) se conoce desde hace muchos años y, por lo tanto, ha sido objeto de interés en muchos aspectos. Se conocen específicamente anticuerpos producidos contra CD3 o contra el Complejo Receptor de células T, del que forma parte CD3. Se ha descrito la caracterización *in vitro* de cinco anticuerpos variantes con función efectora de OKT3 humanizados [1].

El tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 hOKT3gamma1 (Ala-Ala) da como resultado respuestas mejoradas del péptido C y parámetros clínicos durante al menos 2 años después del inicio de la diabetes tipo 1 en ausencia de medicaciones inmunosupresoras continuas [2].

Un enfoque prometedor para mejorar la terapia de anticuerpos dirigida es mediante el suministro de células citotóxicas específicamente a las células cancerosas que expresan el antígeno. Se ha descrito este concepto de uso de células T para la destrucción eficaz de células tumorales [3]. Sin embargo, los estudios clínicos iniciales fueron bastante decepcionantes, principalmente debido a la baja eficacia, los efectos graves adversos (tormenta de citocinas) y la inmunogenicidad de los anticuerpos biespecíficos [4]. Los avances en el diseño y la aplicación de anticuerpos biespecíficos han superado parcialmente la barrera inicial de la tormenta de citocinas y mejorado la eficacia clínica sin toxicidades limitantes de la dosis [5].

Por ejemplo, ciertos anticuerpos biespecíficos que se dirigen con un brazo al antígeno sobre la célula tumoral y con el otro brazo, por ejemplo, a CD3 en las células T, proporcionan la unión al receptor Fc por medio de la región Fc. Al unirse, se forma un complejo de células T, células tumorales y células efectoras que se unen a la región Fc del anticuerpo, lo que conduce a la destrucción de las células tumorales [4]. Catumaxomab consiste en un heterodímero IgG2a de ratón/IgG2b de rata y se ha encontrado que es satisfactorio para el tratamiento de la ascitis asociada al cáncer después de la aplicación intraperitoneal [6]. Sin embargo, el híbrido de ratón/rata es inmunogénico [7] y no se puede aplicar para el tratamiento intravenoso a largo plazo en seres humanos. Los eventos adversos frecuentes relacionados con el tratamiento atribuidos a catumaxomab incluyeron síntomas relacionados con la liberación de citocinas (es decir, pirexia, náuseas, vómitos, escalofríos, taquicardia e hipotensión) [8]-[9], que se relacionan con las funciones efectoras de la región Fc de catumaxomab. Otro anticuerpo es ertumaxomab (HER2xCD3), que induce citotoxicidad en líneas celulares con baja expresión de HER2. Ertumaxomab ha estado en el desarrollo clínico de Fase II para el cáncer de mama metastásico [10]-[11].

Se han descrito anticuerpos contra CD3 que presentan reacción cruzada con CD3 de mono cinomolgo y/o rhesus [12]-[13], sin embargo, se necesitan mejoras adicionales para tales anticuerpos que presentan reacción cruzada.

Se han descrito anticuerpos biespecíficos que exhiben especificidad entre especies para evaluar la seguridad y/o actividad y/o perfil farmacocinético *in vivo* de los mismos en especies no humanas y en seres humanos [85].

Compendio de invención

Un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos contra CD3 humanizados. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une a CD3 humano, en donde dicho anticuerpo comprende una región de unión que comprende una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 10

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención, y una segunda región de unión que se une a una diana diferente que dicha primera región de unión a antígeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 10.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo humanizado según la invención y (ii)

una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo humanizado según a la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula anfitriona que comprende un vector de expresión como el anterior, o un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo humanizado de la invención y un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo humanizado de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo o anticuerpo biespecífico, la composición o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo o anticuerpo biespecífico, la composición o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo o un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de a) cultivar una célula anfitriona de acuerdo con la invención, y b) purificar el anticuerpo del medio de cultivo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de antígeno CD3, o una célula que expresa CD3, en una muestra que comprende las etapas de a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo o anticuerpo biespecífico según la invención, en condiciones que permitir la formación de un complejo entre el anticuerpo o anticuerpo biespecífico y CD3, y b) analizar si se ha formado un complejo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para detectar la presencia de antígeno CD3, o una célula que expresa CD3, en una muestra que comprende i) un anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, y ii) instrucciones para el uso del kit.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1: Muestra curvas de unión (**Figura 1A**) de variantes de anticuerpos monoespecíficos de IgG1-huCD3 y (**Figura 1B**) variantes de anticuerpos biespecíficos bsIgG1 huCD3xHER2 a la línea de células T humanas Jurkat. Los datos que se muestran son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 2. Las tablas muestran las concentraciones de anticuerpo (µg/mL) que dan como resultado una unión semimáxima (CE50).
Figura 2: Muestra curvas de unión (**Figura 2A**) de variantes de anticuerpos monoespecíficos de IgG1-huCD3 y (**Figura 2B**) variantes de anticuerpos biespecíficos bsIgG1 huCD3xHER2 a la línea de células T de cinomolgo HSC-F. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 2.
Figura 3: Activación de células T por variantes de anticuerpos IgG1-huCD3. Expresión de CD69 en células T de origen humano (**Figura 3A**) y de cinomolgo (**Figura 3B**) en el cultivo de PBMC se midió mediante análisis FACS, como se describe en el Ejemplo 3. Estos experimentos se realizaron dos veces y se muestran resultados representativos de un experimento.
Figura 4: Proliferación de células T inducida por variantes de anticuerpos IgG1-huCD3. Se incubaron PBMC humanas (**Figura 4A**) o de cinomolgo (**Figura 4B**) con variantes de anticuerpo IgG1-huCD3 durante 3 días, después de lo cual se midió la proliferación mediante un ELISA de proliferación celular, como se describe en el Ejemplo 4. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.
Figura 5: Se determinó la inducción de citotoxicidad mediada por células T humanas (**Figura 5A**) y de cinomolgo (**Figura 5B**) por variantes de anticuerpos huCD3 con mutaciones LFLEDA no activadoras como se explica en el Ejemplo 5. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes realizados por duplicado.
Figura 6: Muestra curvas de unión de variantes de anticuerpos monoespecíficos no activadoras de IgG1-huCD3 (**Figura 6A**) y variantes de anticuerpos biespecíficos no activadoras bsIgG1-huCD3xHER2 (**Figura 6B**) a la línea de células T humanas Jurkat. Los datos que se muestran son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 2. Las tablas muestran las concentraciones de anticuerpo (µg/mL) que dan como resultado una unión semimáxima (CE50).
Figura 7: Muestra curvas de unión de variantes de anticuerpos monoespecíficos no activadoras de IgG1-huCD3 (**Figura 7A**) y variantes de anticuerpos biespecíficos no activadoras bsIgG1-huCD3xHER2 (**Figura**

7B) a la línea de células T de cinomolgo HSC-F. Los datos mostrados son las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 2. Las tablas muestran las concentraciones de anticuerpo (µg/mL) que dan como resultado una unión semimáxima (CE50).

Figura 8: Activación de células T por variantes de anticuerpos IgG1-huCD3 monoespecíficos no activadoras (**Figura 8A** y B) o bsIgG1-huCD3xHER2 biespecíficos no activadoras (**Figura 8C** y **D**). La expresión de CD69 en células T de origen humano (**Figura 8A** y **C**) y de cinomolgos (**Figura 8B** y **D**) en el cultivo de PBMC se midió mediante análisis FACS, como se describe en el Ejemplo 3. Estos experimentos se realizaron dos veces y se muestran resultados representativos de un experimento.

Figura 9: Proliferación de células T inducida por variantes de anticuerpos IgG1-huCD3 monoespecíficos no activadoras (**Figura 9A** y **B**) o bsIgG1-huCD3xHER2 biespecíficos no activadoras (**Figura 9C** y **D**). La proliferación de células T se midió en PBMC humanas (**Figura 9A** y **C**) o de cinomolgo (**Figura 9B** y **D**) que se incubaron con diversas variantes de anticuerpos durante 3 días, después de lo cual se midió la proliferación mediante un ELISA de proliferación celular, como se describe en el Ejemplo 4. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Figura 10: La 8inducción de citotoxicidad mediada por células T humanas (**Figura 10A**) y de cinomolgo (**Figura 10B**) por variantes de anticuerpos huCD3 con mutaciones LFLEDA no activadoras se determinaron como se explica en el Ejemplo 5. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Figura 11: Activación de células T de rhesus por variantes de anticuerpos IgG1-huCD3. La expresión de CD69 en células T de origen de rhesus en cultivo de PBMC se midió mediante análisis FACS, como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 12: Activación de células T por variantes no activadoras del anticuerpo huCLB-T3/4. Las variantes IgG1-huCLB-T3/4 se titularon en PBMC. La expresión de CD69 en células T en cultivo de PBMC se midió mediante análisis FACS, como se describe en el Ejemplo 7. Se muestran ejemplos representativos de 3 experimentos.

Figura 13: Proliferación de células T por variantes no activadoras del anticuerpo huCLB-T3/4. Las PBMC se incubaron con anticuerpos durante tres días, después de lo cual se midió la proliferación mediante un ELISA de proliferación celular, como se describe en el Ejemplo 8. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Figura 14: Citotoxicidad mediada por células T *in vitro* inducida por variantes de anticuerpos no activadoras de un anticuerpo contra CD3. La inducción de la citotoxicidad mediada por células T por variantes de anticuerpos (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ, LFLEDANQPS [**Figura 14A-G**]) se determinó como se explica en el Ejemplo 9. Se muestran los promedios de dos experimentos realizados por duplicado.

Figura 15: Citotoxicidad mediada por células T *in vitro* inducida por variantes no activadoras de huCLB-T3/4. La inducción de citotoxicidad mediada por células T por variantes de anticuerpos (LFLEDA LAL **[Figura 15A-C]** se determinó como se describe en el Ejemplo 9. Se muestran los promedios de un experimento realizado por duplicado.

Figura 16: Evaluación de la unión de C1q a variantes de anticuerpos huCLB-T3/4 no activadoras. La unión de C1q a IgG1 huCLB-T3/4 monoespecífico (**Figura 16A-C**) y bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2 (**Figura B-D**) y sus variantes de anticuerpos no activadoras se evaluaron mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 10. Los resultados en los gráficos son representativos para n = 2 experimentos.

Figura 17: El análisis farmacocinético (PK) de las variantes de anticuerpos huCLB-T3/4 no activadoras se comparó con el del anticuerpo IgG1-huCLB-T3/4 de tipo salvaje como se describe en el Ejemplo 11. La concentración plasmática de IgG1 humana se representó frente al tiempo (**Figura 17A**). La tasa de aclaramiento plasmática se calculó como se describe en el Ejemplo 11 (**Figura 17B**). La línea punteada horizontal representa la tasa de aclaramiento promedio de los anticuerpos IgG1 humanos en ratones SCID (10 mL/día/kg).

Figura 18: La frecuencia de respuestas positivas de células T entre donantes sanos tipificados con HLA. Los índices SI de ≥1,9 en los ensayos de proliferación y secreción de IL-2 se consideraron respuestas positivas. Se utilizó A33 humanizado como anticuerpo de control de referencia clínico que muestra un alto nivel de inmunogenicidad en la clínica e induce habitualmente respuestas de células T de 20-30% en el ensayo EpiScreen. Se incluyeron respuestas de KLH para verificar la calidad de las PBMC (después de descongelar).

Figura 19: Alineamiento de secuencia de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de los anticuerpos contra CD3 humanizados de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un anticuerpo humanizado o quimérico que se une a CD3 humano, en donde dicho anticuerpo comprende una región de unión que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) que tiene las secuencias que se exponen en SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera (VL) que tienen las secuencias que se exponen en SEQ ID NO: 4, la secuencia GTN y la secuencia que se expone en SEQ ID NO: 5, respectivamente.

El término "anticuerpo", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un

fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período funcionalmente definido relevante (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, mejorar, y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o el tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). La región de unión (o dominio de unión que también se puede emplear en la presente memoria, ambos términos tienen el mismo significado) que interactúa con un antígeno, comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del anfitrión, incluidas varias células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras y las células T) y los componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en la vía clásica de activación del complemento. Como se indicó anteriormente, el término anticuerpo como se emplea en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de interactuar específicamente, tal como la unión al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo completos. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab A/S); (ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab conectados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios V_H y C_H1 y (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, se pueden unir, mediante métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que les permite formarse como una cadena de proteína única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (scFv), véanse por ejemplo Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Tales anticuerpos de cadena sencilla están englobados dentro del término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o se indique claramente por contexto. Aunque tales fragmentos se incluyen generalmente dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, que exhiben diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se analizan adicionalmente en la presente memoria. Asimismo, se debe entender que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

Se pretende que el término "cadena pesada de inmunoglobulina", "cadena pesada de una inmunoglobulina" o "cadena pesada" como se emplea en la presente memoria se refiere a una de las cadenas de una inmunoglobulina. Una cadena pesada está compuesta típicamente por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como VH) y una región constante de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como CH) que define el isotipo de la inmunoglobulina. La región constante de cadena pesada típicamente está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena pesada puede comprender adicionalmente una región bisagra. Se pretende que el término "inmunoglobulina" como se emplea en la presente memoria se refiera a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas de polipéptidos, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), potencialmente interconectados las cuatro por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas está bien caracterizada bien (véase, por ejemplo, [14]). Dentro de la estructura de la inmunoglobulina, las dos cadenas pesadas están interconectadas a través de enlaces disulfuro en la denominada "región bisagra". Al igual que las cadenas pesadas, cada cadena ligera está compuesta típicamente por varias regiones; una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como VL) y una región constante de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como CL). La región constante de cadena ligera típicamente está compuesta por un dominio, CL. Además, las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden tener secuencias hipervariables y/o formar bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase [15]). Las secuencias CDR se pueden determinar mediante el uso del método proporcionado por IMGT [16]-[17].

El término "isotipo", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) o cualquier alotipo de las mismas, tal como IgG1m(za) e IgG1m(f) [SEQ

ID NO: 15]) que está codificado por genes de la región constante de cadena pesada. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada de una inmunoglobulina de la clase IgG1 o cualquier alotipo de la misma. Adicionalmente, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

El término "anticuerpo quimérico" como se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo en donde la región variable se obtiene a partir de una especie no humana (p. ej., derivada de roedores) y la región constante se obtiene a partir de una especie diferente, como la humana. Los anticuerpos quiméricos se pueden generar mediante modificación genética de anticuerpos. "Modificación genética de anticuerpos" es un término genérico utilizado para diferentes tipos de modificaciones de anticuerpos, y que es un procedimiento bien conocido para el experto en la técnica. En particular, se puede generar un anticuerpo quimérico utilizando técnicas de ADN convencionales como se describe en [18]. Por lo tanto, el anticuerpo quimérico puede ser un anticuerpo recombinante modificado genéticamente o enzimáticamente. Está dentro del conocimiento de un experto en la técnica generar un anticuerpo quimérico y, por lo tanto, la generación del anticuerpo quimérico se puede realizar por otros métodos distintos a los descritos en la presente memoria. Los anticuerpos monoclonales quiméricos para aplicaciones terapéuticas se desarrollan para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos. Por lo general, pueden contener regiones variables no humanas (p. ej., murinas), que son específicas para el antígeno de interés, y dominios de cadena pesada y ligera de anticuerpos constantes humanos. Los términos "región variable" o "dominios variables", tal como se emplean en el contexto de los anticuerpos quiméricos, se refieren a una región que comprende las CDR y las regiones marco tanto de las cadenas pesadas como ligeras de la inmunoglobulina.

El término "anticuerpo humanizado", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo no humano modificado genéticamente, que contiene dominios constantes de anticuerpo humano y dominios variables no humanos modificados para contener un alto nivel de homología de secuencia con dominios variables humanos. Esto se puede lograr mediante el injerto de las seis regiones determinantes de la complementariedad de anticuerpos no humanos (CDR), que juntas forman el sitio de unión al antígeno, en una región marco homóloga del receptor humano (FR) (véanse [19]-[20]). Para reconstituir completamente la afinidad de unión y la especificidad del anticuerpo parental, puede ser necesaria la sustitución de los residuos marco del anticuerpo parental (es decir, el anticuerpo no humano) en las regiones marco humanas (retromutaciones). El modelo de homología estructural puede ayudar a identificar los residuos de aminoácido en las regiones marco que son importantes para las propiedades de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de CDR no humanas, principalmente regiones marco humanas que opcionalmente comprenden una o más retromutaciones de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos no humana, y regiones constantes completamente humanas. Opcionalmente, se pueden aplicar modificaciones de aminoácidos adicionales, que no son necesariamente retromutaciones, para obtener un anticuerpo humanizado con características preferidas, tales como afinidad y propiedades bioquímicas.

El anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención se puede denominar "anticuerpo contra CD3 humanizado", "anticuerpo humanizado de la invención", "anticuerpo contra CD3" o "anticuerpo contra CD3 de la invención", que tienen el mismo significado y propósito a menos que el contexto lo contradiga.

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de origen no humano es distinta de la de los anticuerpos de origen humano y, por lo tanto, un anticuerpo no humano es potencialmente inmunogénico cuando se administra a pacientes humanos. Sin embargo, a pesar del origen no humano del anticuerpo, sus segmentos de CDR son responsables de la capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno diana y los objetivos de humanización para mantener la especificidad y la afinidad de unión del anticuerpo. Por lo tanto, la humanización de los anticuerpos terapéuticos no humanos se realiza para minimizar su inmunogenicidad en el hombre, mientras que tales anticuerpos humanizados al mismo tiempo mantienen la especificidad y la afinidad de unión del anticuerpo de origen no humano.

El término "región de unión" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una región de un anticuerpo que es capaz de unirse a cualquier molécula, tal como un polipéptido, p. ej. presente en una célula, bacteria o virión.

El término "unión" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno o diana predeterminados en los que la unión típicamente tiene una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, p. ej. 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos, o aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos cuando se determina mediante, por ejemplo, la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIAcore 3000 que utiliza el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces menor que su afinidad por unirse a un no antígeno específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. El grado en que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo, de modo que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es

altamente específico), el grado en el que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. El término "K_D"(M), como se emplea en la presente memoria, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta.

El término "CD3 humano", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la proteína del Cúmulo de Diferenciación 3 humano que forma parte del complejo proteico co-receptor de células T y está compuesto por cuatro cadenas distintas. CD3 también se encuentra en otras especies y, por lo tanto, el término "CD3" se puede emplear en la presente memoria y no se limita a CD3 humano a menos que el contexto lo contradiga. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3γ (gamma) (cadena CD3γ humano Swissprot P09693, o CD3γ de mono cinomolgo Swissprot Q95LI7), una cadena CD3δ (delta) (CD3δ humano Swissprot P04234, o CD3δ de mono cinomolgo Swissprot Q95LI8), dos cadenas CD3ε (épsilon) (CD3ε humano Swissprot P07766; o CD3ε de cinomolgo Swissprot Q95LI5), CD3ε de rhesus (Swissprot G7NCB9), y una cadena de cadena CD3ζ (zeta) (CD3ζ humano Swissprot P20963, CD3ζ de mono cinomolgo Swissprot Q09TK0). Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como receptor de células T (TCR) y generan una señal de activación en los linfocitos T. Las moléculas TCR y CD3 juntas comprenden el complejo TCR.

Está dentro del conocimiento del experto en la técnica que las secuencias de aminoácidos denominadas números Swissprot incluyen un péptido señal que se elimina después de la traducción de la proteína. Por lo tanto, las proteínas, tales como CD3, presentes en las superficies celulares no incluyen el péptido señal. En particular, las secuencias de aminoácidos enumeradas en la Tabla 1 no contienen tal péptido señal. Las proteínas enumeradas en la Tabla 1 se pueden denominar "proteínas maduras". Por lo tanto, SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de CD3δ (delta) humana madura, SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de CD3ε (épsilon) humana madura, SEQ ID NO: 21 muestra la secuencia de aminoácidos de CD3ε de cinomolgo, y SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de aminoácidos de CD3ε de rhesus madura. Por lo tanto, el término "madura" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una proteína que no comprende ninguna señal o secuencia líder.

Es bien sabido que la homología de la secuencia del péptido señal, la longitud y la posición del sitio de escisión varían significativamente entre las diferentes proteínas. Los péptidos señal se pueden determinar por diferentes métodos, p. ej. SEQ ID NO: 13 de la presente invención se ha determinado de acuerdo con la aplicación SignalP (disponible en http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

En un caso concreto, el anticuerpo humanizado o quimérico de la presente descripción se une a la cadena épsilon de CD3, tal como la cadena épsilon de CD3 humano (SEQ ID NO: 13). En otro caso concreto, el anticuerpo humanizado o quimérico se une a un epítopo dentro de los aminoácidos 1-27 de la porción N-terminal de CD3ε (épsilon) humano (SEQ ID NO: 13). El anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada con otras especies de primates no humanos, tales como los monos cinomolgos (CD3 épsilon de cinomolgo SEQ ID NO: 21) y/o monos rhesus (CD3 épsilon de rhesus SEQ ID NO: 23).

El término "reacción cruzada", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un anticuerpo, tal como un anticuerpo humanizado según la invención, para unirse a su diana en diferentes especies. En particular, el anticuerpo contra CD3 humanizado ilustrado en los ejemplos descritos en la presente memoria, tiene la capacidad de unirse a CD3 humano (Ejemplo 2), de mono cinomolgo (Ejemplo 2) y de mono rhesus.

Un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción que comprende las secuencias de CDR como se define en la presente memoria, que comprende adicionalmente regiones marco puede tener una secuencia diferente fuera de las secuencias de CDR, pero aún conservar la capacidad de unión completa en comparación con el anticuerpo original. Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región variable que tiene una cierta identidad de secuencia con cualquier secuencia descrita en la presente memoria.

El término "identidad de secuencia", como se emplea en el contexto de la presente invención, se refiere al porcentaje de identidad entre dos secuencias en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = Núm. de posiciones idénticas/Núm. total # posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que se deben introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se puede determinar, p. ej., utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller [21]. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch [22]. Se realizan preferiblemente alineamientos múltiples utilizando el algoritmo Clustal W [23] (como se emplea, por ejemplo, en el soporte lógico Vector NTI Advance® versión 11.5; Invitrogen Inc.).

En la invención, la región de unión comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10.

Se pueden generar anticuerpos humanizados mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos de la

región variable de cadena pesada y ligera con una base de datos de secuencias de la región variable de la línea germinal humana para identificar la secuencia humana de la cadena pesada y ligera con el grado apropiado de homología para su uso como regiones marco variables humanas. Se puede diseñar una serie de regiones variables humanizadas de cadena pesada y ligera injertando, p. ej., las CDR murinas en las regiones marco (identificadas como se ha descrito anteriormente) y, si fuera necesario, mediante retromutación (mutación de uno o más de los residuos de aminoácido humanos en las regiones marco para regresar al aminoácido no humano en la posición o posiciones específicas de la secuencia murina específica de residuos identificados que pueden ser críticos para la restauración de la eficacia de la unión del anticuerpo. Se pueden seleccionar las secuencias variantes con la incidencia más baja de epítopos potenciales de células T según lo determinado por la aplicación de tecnologías *in silico*; iTope™ y TCED™ ([24], [25] y [26]).

Además, los anticuerpos humanizados también pueden ser "desinmunizados". Se puede desear la desinmunización, ya que, dentro de una secuencia de proteínas, tal como un anticuerpo humanizado, la presencia de epítopos de células T humanas puede aumentar el perfil de riesgo de inmunogenicidad ya que tienen el potencial de activar las células T auxiliares. Tal activación de las células T auxiliares se puede evitar mediante desinmunización. La desinmunización se puede realizar mediante la introducción de una mutación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado para eliminar los epítopos de células T sin reducir significativamente la afinidad de unión del anticuerpo.

Por lo tanto, en un aspecto de la descripción, el anticuerpo humanizado se puede producir mediante un método que comprende las etapas de (i) comparar la secuencia de cadena pesada variable completa no humana y/o la secuencia de cadena ligera variable completa con una base de datos de secuencias de la línea germinal humana, (ii) seleccionar la secuencia de la línea germinal humana que tiene la mayor homología con la secuencia no humana para obtener una secuencia humanizada, (iii) optimizar la secuencia humanizada mediante una o varias mutaciones inversas si fuera necesario, y (iv) expresar la secuencia en un sistema de expresión adecuado.

Por lo tanto, se puede producir un anticuerpo completo mediante un método que comprende las etapas de (i) comparar la secuencia de cadena pesada variable no humana y las secuencias de cadena ligera variable con una base de datos de secuencias de la línea germinal humana, (ii) seleccionar la secuencia de la línea germinal humana que tiene la mayor homología con la secuencia no humana, (iii) injertar las CDR no humanas en la línea germinal humana seleccionada para obtener secuencias humanizadas, (iv) optimización de las secuencias humanizadas mediante una o varias retromutaciones si fuera necesario, (v) identificar secuencias constantes de cadena pesada y ligera, y (vi) expresar las secuencias completas de cadena pesada y secuencias completas de cadena ligera en sistemas de expresión adecuados. Se puede producir, por lo tanto, un anticuerpo completo como se describe en el Ejemplo 1. Está dentro del conocimiento del experto en la técnica producir un anticuerpo completo cuando se parte de secuencias CDR o secuencias de región variable completas. Por lo tanto, el experto en la técnica sabría cómo generar un anticuerpo completo.

El término "secuencias de cadena pesada completas" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia que consiste en secuencias de cadena pesada variable y de cadena pesada constante.

El término "secuencias de cadena ligera completas" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia que consiste en secuencias de cadena ligera variable y de cadena ligera constante.

Las retromutaciones se pueden introducir mediante mutagénesis de ADN convencional. Tales técnicas convencionales para la mutagénesis de ADN se describen en [18]. Alternativamente, el uso de kits disponibles en el mercado, como el Kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange™ (Stratagene), o las mutaciones inversas deseadas se pueden introducir mediante síntesis de ADN de novo.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo completo. El término "anticuerpo completo" como se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo parental o variante) que contiene todos los dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera que corresponden a los que normalmente se encuentran en un anticuerpo de tipo salvaje de ese isotipo

En una realización, el anticuerpo comprende una región Fc que comprende una primera y una segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina.

El término "región Fc", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una región que comprende, en la dirección del extremo N al extremo C, al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3. Una región Fc puede comprender adicionalmente una región CH1 en el extremo N-terminal de la región bisagra.

El término "región bisagra" como se emplea en la presente memoria se refiere a la región bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región bisagra de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 216-230 de acuerdo con la numeración Eu como establece Kabat.

A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran en la presente memoria de acuerdo con el índice de numeración Eu (descrito en [27]) y se pueden denominar "de acuerdo con la numeración Eu establecida por Kabat", "Numeración Eu según Kabat" o "según el sistema de numeración Eu".

El término "región CH1" o "dominio CH1" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la región CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH1 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 118-215 según el sistema de numeración Eu. Sin embargo, la región CH1 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.

El término "región CH2" o "dominio CH2" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la región CH2 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 231-340 según el sistema de numeración Eu. Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.

El término "región CH3" o "dominio CH3" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 341-447 según el sistema de numeración Eu. Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en la presente memoria.

En una realización, el isotipo de la cadena pesada de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La cadena pesada de inmunoglobulina puede ser cualquier alotipo dentro de cada una de las clases de inmunoglobulina, tala como IgG1m(f) (SEQ ID NO: 15). Por lo tanto, en una realización concreta, el isotipo de las cadenas pesadas de inmunoglobulina es una IgG1, o cualquier alotipo de la misma, tal como IgG1m(f) (SEQ ID NO: 15).

Cuando se dirige al antígeno CD3 que es parte del Receptor de células T (TCR), es deseable el mecanismo específico de destrucción de células de las células T. Pueden no desearse otras funciones efectoras, p. ej. la activación del complemento y, por lo tanto, es deseable la reducción de las funciones efectoras. La unión de C1q es el primer paso en la cascada del complemento y, por lo tanto, sirve como un indicador de la capacidad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos. Si se puede evitar la unión de C1q al anticuerpo, también se puede evitar la activación de la cascada del complemento.

Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo comprende una región Fc que se ha modificado de modo que la unión de C1q a dicho anticuerpo se reduce en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje en al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 99% o 100%, en donde la unión de C1q se determina mediante ELISA.

El término "modificada" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que no es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc de tipo salvaje. Es decir. los residuos de aminoácido en posiciones específicas de la región Fc de tipo salvaje se han sustituido, suprimido o insertado para alterar, por ejemplo, el sitio de unión para C1q, el sitio de unión para otras moléculas efectoras o la unión a receptores Fc (FcR). Tales modificaciones de la secuencia de aminoácidos se pueden preparar sustituyendo uno o más aminoácidos por un aminoácido conservativo o se pueden preparar sustituyendo uno o más aminoácidos por un aminoácido alternativo que sea física y/o funcionalmente similar al aminoácido presente en el tipo salvaje. Las sustituciones también se pueden preparar mediante sustitución por un aminoácido no conservativo.

En el contexto de la presente invención, los aminoácidos se pueden describir como aminoácidos conservativos o no conservativos y, por lo tanto, se pueden clasificar en consecuencia. Los residuos de aminoácido también pueden dividirse en clases definidas por propiedades físicas y funcionales alternativas. Por lo tanto, las clases de aminoácidos se pueden reflejar en una o ambas de las siguientes tablas:

Residuo de aminoácido de clase conservativa

Residuos Ácidos	D y E
Residuos Alcalinos	K, R y H
Residuos hidrófilos sin carga	S, T, N y Q
Residuos alifáticos sin carga	G, A, V, L e I
Residuos no polares sin carga	C, M y P
Residuos Aromáticos	F, Y y W

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de residuos de aminoácido

Residuos que contienen grupos de alcohol.	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados a cicloalquenilo	F, H, W e Y
Residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Residuos con carga negativa	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Residuos cargados positivamente	H, K y R
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Residuos muy pequeños	A, G y S
Residuos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

En el contexto de la presente invención, una sustitución en un anticuerpo se indica como:

Aminoácido original - posición - aminoácido sustituido;
En referencia a la nomenclatura bien reconocida para los aminoácidos, se utiliza el código de tres letras o el código de una letra, incluidos los códigos Xaa y X para indicar cualquier residuo de aminoácido. Por consiguiente, la notación "L234F" o "Leu234Phe" significa que el anticuerpo comprende una sustitución de leucina por fenilalanina en la posición de aminoácido 234.

La sustitución de un aminoácido en una posición dada por cualquier otro aminoácido se denomina:
Aminoácido original - posición; o p. ej. "L234".

Para una modificación en la que los aminoácidos originales y/o los aminoácidos sustituidos pueden comprender más de uno, pero no todos los aminoácidos, el más de un aminoácido puede estar separado por "," o "/". Por ejemplo, la sustitución de leucina por fenilalanina, arginina, lisina o triptófano en la posición 234 es:
"Leu234Phe,Arg,Lys,Trp" o "Leu234Phe/Arg/Lys/Trp" o "L234F,R,K,W" o "L234F/R/K/W" o "L234 por F, R, K o W "

Tal designación se puede utilizar indistintamente en el contexto de la invención, pero tiene el mismo significado y propósito.

Además, el término "una sustitución" abarca una sustitución en cualquiera de los otros diecinueve aminoácidos naturales, o en otros aminoácidos, tales como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido L en la posición 234 incluye cada una de las siguientes sustituciones: 234A, 234C, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 2341, 234K, 234M, 234N, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234P y 234Y. Esto es, por cierto, equivalente a la designación 234X, en la que la X designa cualquier aminoácido que no sea el aminoácido original. Estas sustituciones también se pueden designar como L234A, L234C, etc., o L234A, C, etc., o L234A/C/etc. Lo mismo se aplica por analogía a todas y cada una de las posiciones mencionadas en la presente memoria, para incluir específicamente aquí cualquiera de tales sustituciones.

El anticuerpo según la invención también puede comprender una deleción de un residuo de aminoácido. Tal deleción puede denotarse "del" e incluye, p. ej., la escritura L234del. Por lo tanto, en tales realizaciones, la leucina en la posición 234 se ha suprimido de la secuencia de aminoácidos.

Los términos "aminoácido" y "residuo de aminoácido" se pueden utilizar en la presente memoria indistintamente.

El término "unión de C1q" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la unión de C1q a un anticuerpo, cuando dicho anticuerpo está unido a su antígeno. El término "unido a su antígeno" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la unión de un anticuerpo a su antígeno tanto *in vivo* como *in vitro*

El término "reducir" como se emplea en la presente memoria cuando se refiere a la unión de C1q, se refiere a la capacidad del anticuerpo de acuerdo con la invención para reducir, minimizar o incluso inhibir completamente la unión de C1q al anticuerpo cuando se compara con la unión de C1q a un anticuerpo de tipo salvaje.

El término "anticuerpo de tipo salvaje" como se emplea en la presente memoria, respecto a su uso en ensayos de comparación, se refiere a un anticuerpo que es idéntico al anticuerpo que se va a probar, excepto por no ser inerte.

En este contexto, el término "inerte" se refiere a una región Fc modificada que tiene una unión reducida o nula a C1q como se determina en el Ejemplo 10, es decir, donde la unión a C1q se determina mediante ELISA; proliferación reducida o nula de células T mediada por Fc como se determina en el Ejemplo 4, es decir, la proliferación de células T se mide en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC); y/o expresión de CD69 mediada por Fc reducida o nula como se determina en el Ejemplo 3, es decir, la expresión de CD69 mediada por Fc se determina en un ensayo funcional basado en PBMC. Por lo tanto, el anticuerpo de tipo salvaje comprende los aminoácidos de origen natural en las cadenas pesadas de inmunoglobulina, es decir, un anticuerpo que no comprende ninguna modificación de aminoácidos que pueda alterar o reducir la capacidad del anticuerpo para interactuar, p. ej. C1q, receptores Fc o similares. Por lo tanto, tal anticuerpo de tipo salvaje seguirá siendo un anticuerpo activador que se puede unir, p. ej., a C1q. Un anticuerpo de tipo salvaje y un anticuerpo modificado pueden comprender otras modificaciones de aminoácidos distintas de las que afectan la capacidad del anticuerpo de inducir funciones efectoras, para hacer que el anticuerpo sea un anticuerpo biespecífico o similar.

El término "ELISA", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas que es una prueba que utiliza anticuerpos y cambio de color para identificar una sustancia. Un primer anticuerpo específico se ancla a la superficie de la placa. De este modo, se añade la proteína de una muestra en la que se prueba la unión a dicho primer anticuerpo específico. Se añade un segundo anticuerpo que une al anticuerpo de la muestra. El segundo anticuerpo está conectado a una enzima y, en el paso final, se añade una sustancia que contiene el sustrato de la enzima. La reacción posterior produce una señal detectable, más comúnmente un cambio de color en el sustrato. El concepto del método ELISA es bien conocido en la técnica y se contemplan diversas formas de realizar un ELISA como parte de un método para evaluar el anticuerpo según la invención. Por lo tanto, esta interpretación no se debe entender como limitante, ya que se pueden realizar diversas formas de ELISA, como se describe en el Ejemplo 4.

Específicamente, la capacidad de un anticuerpo según la presente invención para unirse a C1q se puede determinar mediante ELISA que comprende las etapas de (i) aplicar como recubrimiento dicho anticuerpo sobre una placa de 96 pocillos, (ii) añadir suero al 3%, (iii) añadir un anticuerpo anti-C1q humano, (iv) desarrollar la placa y (v) medir DO_{405} nm. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo comprende una región Fc que se ha modificado de modo que la unión de C1q a dicho anticuerpo se reduce en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje en al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o 100%, en donde la unión de C1q se determina mediante ELISA que comprende las etapas de (i) aplicar como recubrimiento dichos anticuerpos sobre una placa de 96 pocillos, (ii) añadir suero al 3%, (iii) añadir un anti-C1q humano, (iv) desarrollar la placa, y (v) medir DO_{405} nm. Por lo tanto, en una realización concreta, la unión de C1q se evalúa como se describe en el Ejemplo 10.

Los términos "receptor Fc" o "FcR", como se emplean en la presente memoria, se refieren a una proteína que se encuentra en la superficie de ciertas células. Los FcR se unen a la región Fc de los anticuerpos. Existen varios tipos diferentes de FcR que se clasifican según el tipo de anticuerpo que reconocen. Por ejemplo, los receptores Fcγ (gamma) se unen a los anticuerpos de la clase IgG.

Los términos "Receptor Fcγ", "Receptor Fc gamma" o "FcγR", como se emplean en la presente memoria, se refieren a un grupo de Receptores Fc que pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas y son los receptores Fc más importantes para inducir la fagocitosis de microbios opsonizados (recubiertos). Esta familia incluye varios miembros, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIIb (CD16b), que difieren en sus afinidades de anticuerpos debido a su diferente estructura molecular.

Las funciones efectoras mediadas por Fc forman parte de la actividad biológica de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG) humana. Los ejemplos de tales funciones efectoras incluyen, p. ej. citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) que se desencadena por la unión de diversas moléculas efectoras a la región Fc. En el contexto de la presente invención, "unión de Fc", "unión al receptor Fc", "unión a FcR" y "unión de una región Fc de anticuerpo a FcR" se refiere a la unión de la región Fc a un receptor Fc (FcR) o una molécula efectora. Los términos "unión de FcyR" y "unión de FcyRI" se refieren a la unión a, o de, una región Fc al receptor Fc gamma y al receptor Fc gamma I, respectivamente. Cuando un anticuerpo contra CD3 se une a las células T, la región Fc de tipo salvaje del anticuerpo contra CD3 se une a los FcR presentes en otras células, p. ej. monocitos, lo que conduce a la activación no específica, mediada por Fc de la célula T. Tal activación de células T mediada por Fc no específica puede no ser deseada. Las células T también se pueden activar mediante la activación de células T dirigida o específica de la diana. Tal activación dirigida de células T puede ser altamente deseable para el tratamiento de una variedad de indicaciones, tal como el cáncer. El término "activación de células T dirigida" como se emplea en la presente memoria, se refiere al direccionamiento de las células T a células específicas, tales como células tumorales mediante el uso de un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión que se une a una diana específica, tal como una diana tumoral en una célula tumoral y una segunda región de unión que se une a una diana específica de células T, tal como CD3. Por lo tanto, el direccionamiento de las células T a células específicas, p. ej. células tumorales se puede facilitar mediante el uso de un anticuerpo biespecífico, en donde una de las regiones de unión se une a CD3 presente en la célula T y la otra región de unión se une a un antígeno diana específico, p. ej. en una célula tumoral. Aunque, la activación de

células T mediada por Fc no específica todavía puede ser posible y, por lo tanto, se debe evitar tal activación de células T mediada por Fc no específica no deseada a través del entrecruzamiento mediado por Fc y se puede desactivar volviendo la región Fc inerte para tal actividad. De este modo, se evita la interacción entre dicha región Fc inerte con los receptores Fc presentes. Se ha demostrado que un anticuerpo humanizado de la presente invención es inerte cuando se prueba en varios ensayos diferentes, es decir, véanse los Ejemplos 3 a 5. Otro anticuerpo contra CD3 probado, huCLB-T3/4, que comprende modificaciones de aminoácidos en la región Fc también demostró ser inerte cuando se prueba en diferentes ensayos, es decir, véanse los ejemplos 7 a 10. El anticuerpo contra CD3 humanizado según la presente invención que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A, como se describe en los ejemplos, mostró bajos niveles de expresión de CD69 en T- células (Ejemplo 3), anulación de la proliferación de células T mediada por Fc (Ejemplo 4), y ninguna destrucción de diana no específica cuando está en forma de un anticuerpo biespecífico (Ejemplo 5). Por lo tanto, un anticuerpo humanizado de la presente invención muestra resultados superiores en varios ensayos en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje.

Un anticuerpo según la presente invención puede comprender modificaciones en la región Fc. Cuando un anticuerpo comprende tales modificaciones, se puede convertir en un anticuerpo inerte o no activador. El término "carácter inerte", "inerte" o "no activador", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una región Fc que al menos no puede unirse a ningún Receptor Fcγ, inducir el entrecruzamiento mediado por Fc de FcR o inducir el entrecruzamiento mediado por FcR de antígenos diana a través de dos regiones Fc de anticuerpos individuales, o no puede unirse a C1q. El carácter inerte de una región Fc de un anticuerpo contra CD3 humanizado o quimérico se prueba ventajosamente utilizando el anticuerpo en un formato monoespecífico, aunque se puede utilizar una región Fc inerte así identificada en anticuerpos contra CD3 biespecíficos u otros anticuerpos contra CD3 humanizados o quiméricos multiespecíficos.

Se pueden construir diversas variantes para hacer que la región Fc de un anticuerpo sea inactiva para las interacciones con los receptores Fc gamma y C1q para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos. Los ejemplos de tales variantes se describen en la presente memoria.

Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo comprende una región Fc que se ha modificado de modo que dicho anticuerpo media la menor proliferación de células T mediada por Fc en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje en al menos 50%, al menos 60%, al menos 70 %, al menos 80%, al menos 90%, al menos 99% o 100%, en donde dicha proliferación de células T se mide en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

El término "reducir" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una reducción de la actividad o expresión en comparación con una proteína de control, tal como un anticuerpo. En particular, el término "reducir" cuando se refiere a la proliferación de células T, se refiere a la capacidad del anticuerpo según la invención para reducir, minimizar o incluso inhibir completamente la proliferación de células T en comparación con la proliferación de células T unidas mediante un anticuerpo de tipo salvaje. La capacidad de un anticuerpo para reducir la proliferación de células T se puede evaluar mediante un ensayo funcional basado en PBMC, como se describe en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 8. En una realización, el ensayo se realiza con PBMC humanas. En otra realización, el ensayo se realiza con PBMC de cinomolgo. En otra realización más, el ensayo se realiza con PBMC de rhesus. Dado que los anticuerpos de acuerdo con la presente invención presentan reacción cruzada, se puede realizar un ensayo basado en PBMC como se describe en la presente memoria con PBMC de cualquier especie para mostrar la reducción de la proliferación de células T siempre que las PBMC de la especie utilizada estén dentro de los espectros de reactividad cruzada de los anticuerpos, p. ej. seres humanos, monos cinomolgos o rhesus.

El término "ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un ensayo utilizado para evaluar una característica funcional del anticuerpo de la presente invención, tal como la capacidad de dicho anticuerpo para afectar a la proliferación de células T o la expresión de CD69, en donde las únicas células presentes son células mononucleares de sangre periférica. Por lo tanto, en una realización, la proliferación de células T se mide mediante un método que comprende las etapas de incubar PBMC con anticuerpo en el intervalo de 1-1000 ng/mL a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% (vol/vol) durante tres días, añadiendo un compuesto químico, tal como BrdU, que se incorpora al ADN de las células en proliferación, incubando durante cinco horas, sedimentando las células, secando las células, opcionalmente almacenando las células a 4°C, aplicando como recubrimiento las células en placas de ELISA, incubando con anti-BrdU-peroxidasa durante 90 minutos a temperatura ambiente, desarrollando durante aproximadamente 30 minutos con 1 mg/mL de ácido 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), añadiendo 100 µL de ácido oxálico al 2% para detener la reacción y midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas adecuado.

El término "proliferación", como se emplea en la presente memoria, se refiere al crecimiento celular en el contexto de la división celular.

El término "BrdU", como se emplea en la presente memoria, se refiere a 5-bromo-2'-desoxiuridina, que es un

homólogo de timidina. Cuando se añade BrdU al cultivo celular durante un período de tiempo limitado (p. ej., 4 horas), se incorporará al ADN de las células en proliferación. Después de fijar las células, la detección de la BrdU incorporada puede realizarse en un ELISA utilizando anti-BrdU-peroxidasa. La incorporación de BrdU es, por lo tanto, una medida para la proliferación.

En una realización, el anticuerpo comprende una región Fc que se ha modificado de modo que dicho anticuerpo reduce la expresión de CD69 mediada por Fc en al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 99% o 100% en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje en donde dicha expresión de CD69 mediada por Fc se determina en un ensayo funcional basado en PBMC.

El término "reducir" como se emplea en la presente memoria, se refiere a una reducción de la actividad o expresión en comparación con una proteína de control, tal como un anticuerpo. En particular, el término "reducir" cuando se refiere al nivel de expresión del marcador de activación de células T CD69, se refiere a una reducción del nivel de expresión de CD69 cuando se compara con el nivel de expresión de CD69 cuando la célula T está unida mediante un anticuerpo de tipo salvaje siempre que ambas regiones de unión del anticuerpo se unan a CD3. La capacidad de un anticuerpo para reducir la expresión de CD69 se puede evaluar mediante un ensayo funcional basado en PBMC, como se describe en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 7. Por lo tanto, en una realización, la expresión de CD69 se mide mediante un método que comprende las etapas de incubación de PBMC con un anticuerpo en el intervalo de 1-1000 ng/mL a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% (vol/vol) durante 16-24 horas, lavado de las células, tinción de las células a 4°C con un anticuerpo anti-CD28-PE humano de ratón y anti-CD69-APC humano de ratón, y determinación de la expresión de CD69 en células positivas para CD28 mediante citometría de flujo.

El término "CD69", como se emplea en la presente memoria, se refiere al Cúmulo de Diferenciación 69 que es una proteína lectina de tipo C transmembrana humana codificada por el gen *CD69*. La activación de los linfocitos T y de las células asesinas naturales (NK), ambas *en vivo* e *in vitro* induce la expresión de CD69. CD69 funciona como un receptor de transmisión de señales implicado en eventos de activación celular, incluida la proliferación, funciona como un receptor de transmisión de señal en linfocitos, incluidas las células asesinas naturales y las plaquetas, y la inducción de genes específicos.

El término "ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un ensayo utilizado para evaluar una característica funcional del anticuerpo de la presente invención, tal como la capacidad de dicho anticuerpo para afectar a la proliferación de células T o a la expresión de CD69, en donde las únicas células presentes son células mononucleares de sangre periférica. Un ensayo funcional basado en PBMC como se describe en los Ejemplos 3, 4, 5 y 7 comprende las etapas de (i) incubar PBMC con un anticuerpo a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% (vol/vol) durante aproximadamente 16-24 h, (ii) lavar las células, (iii) teñir las células a 4°C con un anticuerpo anti-CD28-PE humano de ratón y un anticuerpo anti-CD69-APC humano de ratón, y (iv) determinar la expresión de CD69 en células positivas para CD28 mediante citometría de flujo, cuando se evalúa la expresión de CD69. Por lo tanto, en una realización, la expresión de CD69 se puede determinar como se describe en los Ejemplos 3, 4, 5 o 7.

Por lo tanto, los aminoácidos en la región Fc que juegan un papel dominante en las interacciones con C1q y los receptores Fc gamma se pueden modificar. Los ejemplos de posiciones de aminoácidos que se pueden modificar incluyen las posiciones L234, L235 y P331. Sus combinaciones, tales como L234F/L235E/P331S, pueden causar una disminución profunda en la unión a CD64, CD32A, CD16 y C1q humanos.

Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en al menos una posición correspondiente a L234, L235 y P331, puede ser A, A y S, respectivamente ([1], [28]). Asimismo, las sustituciones de aminoácidos L234F y L235E pueden dar como resultado regiones Fc con interacciones anuladas con los Receptores Fc Gamma y C1q ([29]-[30]). Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235, pueden ser F y E, respectivamente. Una sustitución de aminoácidos D265A puede disminuir la unión a todos los receptores Fc gamma y prevenir la ADCC ([31]). Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en la posición correspondiente a D265 puede ser A. La unión a C1q puede ser anulada por las posiciones de mutación D270, K322, P329 y P331. La mutación de estas posiciones a D270A o K322A o P329A o P331A puede hacer que el anticuerpo tenga una actividad de CDC deficiente ([32]). Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos en al menos una posición correspondiente a D270, K322, P329 y P331, pueden ser A, A, A y A, respectivamente.

Un enfoque alternativo para minimizar la interacción de la región Fc con los receptores Fc gamma y C1q es mediante la eliminación del sitio de glicosilación de un anticuerpo. Mutando la posición N297 a, p. ej. Q, A y E se elimina un sitio de glicosilación que es crítico para las interacciones IgG-Receptor Fc gamma. Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a N297, puede ser G, Q, A o E ([33]). Otro enfoque alternativo para minimizar la interacción de la región Fc con los Receptores Fc gamma se puede obtener mediante las siguientes mutaciones; P238A, A327Q, P329A o E233P/L234V/L235A/G236del ([31]).

Alternativamente, las subclases IgG2 e IgG4 humanas se consideran naturalmente comprometidas en sus

interacciones con los receptores gamma C1q y Fc, aunque se informó sobre interacciones con los receptores Fcγ (Receptores Fc gamma) ([34]-[35]). Las mutaciones que anulan estas interacciones residuales se pueden realizar en ambos isotipos, lo que da como resultado la reducción de los efectos secundarios no deseados asociados con la unión de FcR. Para IgG2, estos incluyen L234A y G237A, y para IgG4, L235E. Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a L234 y G237 en una cadena pesada de IgG2 humana, puede ser A y A, respectivamente. En una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a L235 en una cadena pesada de IgG4 humana, puede ser E.

Otros enfoques para minimizar adicionalmente la interacción con los receptores Fc gamma y C1q en los anticuerpos IgG2 incluyen los descritos en [36] y [37].

La región bisagra del anticuerpo también puede ser importante con respecto a las interacciones con los Receptores Fc gamma y el complemento ([38]-[39]). Por consiguiente, las mutaciones o la deleción de la región bisagra pueden influir en las funciones efectoras de un anticuerpo.

El término "entrecruzamiento", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la formación indirecta de puentes de los brazos Fab del anticuerpo (monovalentemente o bivalentemente) unidos al antígeno diana por la célula portadora de FcR a través de la unión a la región Fc del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo que se une a su antígeno diana en células portadoras de antígeno diana se puede entrecruzar con otra célula que expresa FcR.

El término "destrucción inespecífica" como se emplea en la presente memoria, se refiere a la destrucción de células por la función citotóxica de las células T u otras células efectoras, a través de la activación independiente de antígeno diana tumoral de dichas células. Por lo tanto, por destrucción inespecífica se entiende que las células portadoras de la diana tumoral pueden ser destruidas mediante, p. ej., células T citotóxicas y no por el anticuerpo que se une a la diana tumoral mediante, p. ej., inducción de CDC.

Los autores de la presente invención han demostrado (véanse los Ejemplos 3 a 5, 7 a 10) que se puede obtener una región Fc no activadora modificando una o más de al menos cinco posiciones de aminoácidos específicas en la región Fc.

Así, en una realización, el anticuerpo comprende una primera y una segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina, en donde al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235, D265, N297, y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L, D, N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadena pesada, uno o más aminoácidos en la posición correspondiente a las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L, D, N, y P, respectivamente.

En otra realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L y D, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

El término "aminoácido correspondiente a las posiciones" como se emplea en la presente memoria se refiere a un número de posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana. A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, los aminoácidos de las secuencias de la región constante se numeran en la presente memoria de acuerdo con el índice de numeración Eu (descrito en [27]). Por lo tanto, un aminoácido o segmento en una secuencia que "corresponde a" un aminoácido o segmento en otra secuencia es aquel que se alinea con el otro aminoácido o segmento utilizando un programa de alineamiento de secuencia convencional tal como ALIGN, ClustalW o similar, típicamente en configuración predeterminada y tiene al menos 50%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de identidad con una cadena pesada de IgG1 humana. Se considera bien conocido en la técnica cómo alinear una secuencia o segmento en una secuencia y así determinar la posición correspondiente en una secuencia a una posición de aminoácido de acuerdo con la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el aminoácido se puede definir como se ha descrito anteriormente.

Se debe entender que el término "el aminoácido no es" o una frase similar cuando se refiere a aminoácidos en una cadena pesada significa que el aminoácido es cualquier otro aminoácido distinto del aminoácido específico mencionado. Por ejemplo, el aminoácido en la posición correspondiente a L234 en una cadena pesada de IgG1 humana no es L, significa que el aminoácido puede ser cualquiera de los otros aminoácidos naturales o no naturales distinto de L.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición

correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es D.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es D, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos hidrófobos o polares.

El término "hidrófobo", como se emplea en la presente memoria respecto a un residuo de aminoácido, se refiere a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y.

El término "polar" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T. Así, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG humana se selecciona del grupo que consiste en; C, E, H, K, N, Q, R, S y T.

En otra realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana es un aminoácido alifático sin carga, aromático o ácido.

El término "alifático sin carga" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, I, L y V. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, G, I, L y V.

El término "aromático" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: F, T y W. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; F, T y W.

El término "ácido" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido elegido del grupo que consiste en: D y E. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; D y E.

En una realización concreta, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, E, F, G, I, L, T, V y W.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es D.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es D, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana es un aminoácido hidrófobo o polar.

El término "hidrófobo", como se emplea en la presente memoria respecto a un residuo de aminoácido, se refiere a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y. Así, en una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y.

El término "polar" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T. Por lo tanto, en una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada humana se selecciona del grupo que consiste en; C, E, H, K, N, Q, R, S y T. En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición D265 en una cadena pesada humana se seleccionan del grupo que consiste en; C, E, H, K, N, Q, R, S y T.

En otra realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana es un aminoácido alifático sin carga, aromático o ácido.

El término "alifático sin carga" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, I, L y V. Por lo tanto, en una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, G, I, L y V.

El término "aromático" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: F, T y W. Por lo tanto, en una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; F, T y W.

El término "ácido" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido elegido del grupo que consiste en: D y E. Por lo tanto, en una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; D y E.

En una realización concreta, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, E, F, G, I, L, T, V y W.

En otra realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición N297 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es N.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a N297 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es N, y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, es P.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a las posiciones N297 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es N.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadena pesada, el aminoácido en la posición correspondiente a N297 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es N, y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, es P.

En otra realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L y L, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L y L, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana son N y P, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan del grupo que consiste en; A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las

posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos hidrófobos o polares.

El término "hidrófobo", como se emplea en la presente memoria respecto a un residuo de aminoácido, se refiere a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y. Así, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W e Y.

El término "polar" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, se seleccionan cada uno del grupo de aminoácidos que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T.

En una realización concreta, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L ni L, respectivamente.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L ni L, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos hidrófobos o polares.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W e Y.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo de aminoácidos que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T.

En una realización concreta, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y.

En otra realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos alifáticos sin carga, aromáticos o ácidos.

El término "alifático sin carga" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, I, L y V. Por lo tanto, en una realización, en al menos de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, G, I y V.

El término "aromático" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: F, T y W. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; F, T y W.

El término "ácido" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido elegido del grupo que consiste en: D y E. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste

en; D y E.

En una realización concreta, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, D, E, F, G, I, T, V y W.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F y E; o A y A, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F y E; o A y A, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F y E; o A y A, respectivamente.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F y E; o A y A, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización concreta, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F y E, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F y E, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, al menos los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son A y A, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, al menos los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, son A y A, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L y D, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L y D, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan del grupo que consiste en; A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V y W, y el aminoácido correspondiente a la posición D265 se selecciona del grupo que consiste en; A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V y W.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos hidrófobos o polares.

El término "hidrófobo", como se emplea en la presente memoria respecto a un residuo de aminoácido, se refiere a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo formado por; A,

C, F, G, H, I, M, R, T, V, W e Y.

El término "polar" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, cada uno se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada humana se selecciona del grupo que consiste en; C, E, H, K, N, Q, R, S y T.

En una realización concreta, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y, y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en un la cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos hidrófobos o polares.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo formado por; A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W e Y.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo de aminoácidos que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada humana se selecciona del grupo que consiste en; C, E, H, K, N, Q, R, S y T.

En una realización concreta, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y, y el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en un la cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y.

En otra realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos alifáticos sin carga, aromáticos o ácidos.

El término "alifático sin carga" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, I, L y V. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, G, I, L y V, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, G, I y V.

El término "aromático" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: F, T y W. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; F, T y W.

El término "ácido" como se emplea en la presente memoria respecto a los residuos de aminoácido, se refiere a cualquier residuo de aminoácido elegido del grupo que consiste en: D y E. Por lo tanto, en una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; D y E.

En una realización concreta, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, E, F, G, I, L, T, V y W, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 se

seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, D, E, F, G, I, T, V y W.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L y D, respectivamente.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L y D, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos alifáticos sin carga, aromáticos o ácidos.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, G, I, L y V, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, G, I y V.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; D y E.

En una realización concreta, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en; A, E, F, G, I, L, T, V y W, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 se seleccionan cada uno del grupo que consiste en; A, D, E, F, G, I, T, V y W.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A; o A, A y A, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A; o A, A y A, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A; o A, A y A, respectivamente.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A; o A, A y A, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente.

En una realización concreta, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son A, A y A, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son A, A y A, respectivamente.

En otra realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las

posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E, A, Q, y S, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en dicha segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E, A, Q y S, respectivamente.

En una realización concreta, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 8, una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10, y en al menos una de las cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 8, una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 12, y en al menos una de las cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6, una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10, y en al menos una de las cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6, una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 12, y en al menos una de las cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 9, una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10, y en al menos una de las cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 9, una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 12, y en al menos una de las cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos una primera región de unión de un anticuerpo según la invención, y una o más regiones de unión que se unen a una o más dianas diferentes que la primera región de unión. Tal anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo biespecífico.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención, y una segunda región de unión que se une a una diana diferente que la primera región de unión.

El término "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para al menos dos, tal como al menos tres, epítopos diferentes típicamente no solapantes. Tales epítopos pueden estar sobre la misma diana o sobre dianas diferentes. Si los epítopos están sobre dianas diferentes, tales dianas pueden estar sobre la misma célula o sobre células o tipos de células diferentes.

El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para al menos dos epítopos diferentes, típicamente no solapantes. Tales epítopos pueden estar sobre la misma diana o sobre dianas diferentes. Si los epítopos están sobre dianas diferentes, dichas dianas pueden estar sobre la misma célula o sobre células o tipos de células diferentes.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera y una segunda cadenas pesadas.

Las realizaciones relacionadas con la modificación de la región Fc y las realizaciones relacionadas con sustituciones de aminoácidos específicas se consideran parte de cualquier anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención. Por lo tanto, en una realización, al menos una de la primera y segunda cadenas pesadas comprende uno o más aminoácidos modificados como se define en cualquier realización descrita en la presente memoria, tales como los descritos para proporcionar una región Fc inerte. En una realización, ambas dichas primera y segunda cadenas pesadas comprenden uno o más aminoácidos modificados como se define en cualquier realización descrita en la

presente memoria, tales como las descritas para proporcionar una región Fc inerte. Por consiguiente, el anticuerpo biespecífico comprende una región Fc modificada de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria; o al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas comprende uno o más aminoácidos modificados como se define en cualquier aspecto o realización descritos en la presenta memoria.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6 y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; y donde la región Fc se ha modificado de modo que la unión de C1q a dicho anticuerpo se reduce en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje en al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, o 100%, en donde la unión de C1q se determina mediante ELISA.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6 y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; y en donde la región Fc se ha modificado de modo que dicho anticuerpo media la menor proliferación de células T mediada por Fc en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje en al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, a al menos 90%, al menos 99% o 100%, en donde dicha proliferación de células T se mide en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6 y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; y en donde la región Fc se ha modificado de modo que dicho anticuerpo reduce la expresión de CD69 mediada por Fc en al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 99% o 100 % en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje en el que dicha expresión de CD69 mediada por Fc se determina en un ensayo funcional basado en PBMC.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6 y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; y en donde al menos en una de las primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

Los ejemplos de moléculas de anticuerpos biespecíficos que se pueden utilizar en la presente invención comprenden (i) un solo anticuerpo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión a antígeno, (ii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para dos epítopos diferentes, p. ej., a través de dos scFv conectados en tándem por un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig™), donde cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto ([40]); (iv) un fragmento biespecífico (Fab')2 conectado químicamente; (v) un TandAb®, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vi) un flexicuerpo "flexibody", que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (vii) una denominada molécula de "acoplamiento y bloqueo" (Dock-and-Lock®), basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la Proteína Quinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste de dos fragmentos Fab idénticos conectados a un fragmento Fab diferente; (viii) una denominada molécula Scorpion, que comprende, p. ej., dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un anticuerpo biespecífico que combina dos o más elementos que reconocen antígenos "cross-body", o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio controlado del brazo Fab, p. ej. DuoBody® (como se describe en [41]) como los descritos en la presente invención.

Los ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a (i) moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas de direccionamiento dual de tipo IgG recombinantes, en donde los dos lados de la molécula contienen cada uno el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; (iii) moléculas de fusión de IgG, en donde los anticuerpos IgG completos se fusionan con un fragmento Fab adicional o partes del fragmento Fab; (iv) moléculas de fusión de Fc, en donde las moléculas de Fv de cadena sencilla o los diacuerpos estabilizados se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos; (v) moléculas de fusión de Fab, en donde diferentes fragmentos Fab se fusionan entre sí, se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos; y (vi) anticuerpos de cadena pesada y basados en ScFv y diacuerpos (p. ej., anticuerpos de dominio, Nanobodies®) en donde se fusionan diferentes moléculas de Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o anticuerpos de cadena pesada diferentes (p. ej., anticuerpos de dominio, Nanobodies®) entre sí o a otra proteína o molécula portadora fusionada a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos.

Los ejemplos de moléculas de tipo IgG con moléculas con dominios CH3 complementarios incluyen, entre otros,

Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, [42]), Botones en Ojales “Knobs-into-Holes” (Genentech, [43]), CrossMAbs (Roche, [44]) y las emparejadas electrostáticamente (Amgen, [45]-[46]; Chugai, [47]; Oncomed, [48]), LUZ-Y (Genentech), DIG-body y PIG-body (Pharmabcine), el anticuerpo de Dominio Modificado por Intercambio de Cadenas (SEEDbody) (EMD Serono, [49]), Biclonics (Merus), FcΔAdp (Regeneron, [50]), IgG1 e IgG2 biespecíficas (Pfizer/Rinat, [51]), plataforma Azymetric (Zymeworks/Merck, [52]), mAb-Fv (Xencor, [53]), anticuerpos biespecíficos bivalentes (Roche) y moléculas DuoBody® (Genmab A/S, [41]).

Los ejemplos de moléculas de direccionamiento dual de tipo IgG recombinantes incluyen, pero no se limitan a, Ig de Direccionamiento Dual (DT) (GSK/Domantis), Anticuerpo Dos en uno (Genentech), Mab Entrecruzados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, [54]), Zybodies™ (Zyngenia), enfoques con una cadena ligera común (Crucell/Merus, [55]), κλBodies (NovImmune) y CovX-body (CovX/Pfizer).

Los ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, entre otros, Ig de Dominio Variable Dual (DVD)-Ig™ (Abbott, [56]), Anticuerpos de doble cabeza de dominio dual (Unilever; Sanofi Aventis, [57]), Biespecífico de tipo IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, [58]), fusión de scFv (Novartis), fusión de scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, [59]) y TvAb (Roche, [59], [60]).

Los ejemplos de moléculas de fusión Fc incluyen, entre otros, Fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Tecnología de Redireccionamiento de Afinidad Dual (Fc-DART™) (MacroGenics, [62], [63]) y Dual(ScFv)2-Fab (Centro Nacional de Investigación de Medicina de Anticuerpos - China).

Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión de Fab incluyen, entre otros, F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech).

Los ejemplos de anticuerpos ScFv, basados en diacuerpos y anticuerpos de dominio incluyen, pero no se limitan a, Acoplador biespecífico de células T (BiTE®) (Micromet, Diacuerpo en Tándem (Tandab™) (Affimed), Tecnología de Redireccionamiento Afinidad Dual (DART) (MacroGenics), Diacuerpo de Cadena Sencilla (Academic), Anticuerpos de tipo TCR (AIT, ReceptorLogics), Fusión ScFv de Albúmina de Suero Humano (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanobodies® de direccionamiento dual (Ablynx), anticuerpos de dominio único de cadena pesada de direccionamiento dual.

Se contempla adicionalmente que cualquier anticuerpo monoespecífico que cumpla las condiciones de ensayo descritas en la presente memoria pueda formar la base de un anticuerpo biespecífico. Es decir, se puede originar un anticuerpo biespecífico en el que una de las regiones de unión se une a CD3 a partir de cualquier anticuerpo monoespecífico CD3 probado en los ensayos funcionales y que cumple los requisitos establecidos en la presente memoria. Tal anticuerpo biespecífico se puede proporcionar mediante los métodos descritos en [41]. Por lo tanto, en una realización concreta, cada una de dichas primera y segunda cadenas pesadas comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y CH3, en donde en dicha primera cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana ha sido sustituido, y en dicha segunda cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana ha sido sustituido, y en donde dicha primera y dicha segunda cadenas pesadas no están sustituidas en las mismas posiciones. En este contexto, el término "sustituido" se refiere a que el aminoácido en una posición de aminoácido específica ha sido sustituido por otro aminoácido natural o no natural. Por lo tanto, un aminoácido "sustituido" en una posición correspondiente a la posición en una cadena pesada de IgG1 humana significa que el aminoácido en la posición concreta es diferente del aminoácido natural en una cadena pesada de IgG1.

En una realización, en dicha primera cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana no es K, L o M, y opcionalmente el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es F, y en dicha segunda cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en; T366, L368, K370, D399, F405 e Y407 en una cadena pesada de IgG1 humana ha sido sustituido.

En una realización, en dicha primera cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana no es K, L o M, y en dicha segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F y, opcionalmente, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K.

En una realización, en dicha primera cadena pesada, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F, R y G, y en dicha segunda cadena pesada los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en; T366, L368, K370, D399, Y407

y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana han sido sustituidos.

En una realización, el aminoácido en posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana no es K, L o M en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F.

En una realización adicional, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en dicha segunda cadena pesada cadena o viceversa.

Así, en una realización, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la segunda cadena pesada.

En una realización adicional, el anticuerpo contra CD3 humanizado de la invención contiene en al menos una de la primera y segunda cadenas pesadas una o más de las sustituciones inactivadoras como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, tales como L234F, L235E y D265A; y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 no es F. En una realización, el anticuerpo contra CD3 humanizado de la invención contiene en al menos una de la primera y segunda cadenas pesadas una o más de las sustituciones inactivadoras como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, tales como L234F, L235E y D265A; y una sustitución adicional en la posición K409, tal como K409R. En particular, en una realización, el anticuerpo contra CD3 humanizado de la invención contiene tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas una o más de las sustituciones inactivadoras como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, tales como L234F, L235E y D265A; y una sustitución en la posición F405, tal como F405L. En una realización, el anticuerpo contra CD3 humanizado de la invención contiene tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas una o más de las sustituciones inactivadoras como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, tales como L234F, L235E y D265A; y una sustitución adicional en la posición K409, tal como K409R. Tales anticuerpos son útiles para generar un anticuerpo biespecífico.

Por consiguiente, en una realización adicional, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la segunda cadena pesada.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E, A, N y P respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la segunda cadena pesada.

En una realización alternativa, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la segunda cadena pesada.

En una realización, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E, A, N y P respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la segunda cadena pesada.

En otra realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente. a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la segunda cadena pesada.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E, A, N y P respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la segunda cadena pesada.

En una realización alternativa, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la segunda cadena pesada.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E, A, N y P respectivamente, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en la primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en la segunda cadena pesada.

Como se describe en la presente memoria, el reclutamiento de células T a células diana específicas, tales como las células cancerosas o tumorales, proporciona una forma de destruir las células diana. Los autores de la presente invención han demostrado que un anticuerpo biespecífico contra CD3xHER2 que comprende las sustituciones de aminoácidos específicas L234F, L235E y D265A en ambas cadenas pesadas, fue capaz de inducir la destrucción de células AU565 como se describe en el Ejemplo 5. La destrucción mediada por células T puede ser obtenida mediante un anticuerpo biespecífico dirigido a CD3 con la primera región de unión y a otra diana con la segunda región de unión. Por lo tanto, en una realización, la primera región de unión está de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria para el anticuerpo contra CD3 humanizado, y la segunda región de unión se une a una diana diferente que la primera región de unión. Se debe entender que cuando el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, al menos la mitad del anticuerpo, es decir, uno de los pares de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, es un anticuerpo humanizado de la invención. Por lo tanto, una mitad del anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humanizado que se une CD3 de acuerdo con la presente invención y la otra mitad puede ser humanizada, quimérica, completamente no humana o completamente humana que se une a una segunda diana. Así, en una realización, el anticuerpo comprende una primera y una segunda cadenas pesadas, una primera y segunda cadenas ligeras, en donde dicha primera cadena pesada y dicha primera cadena ligera son humanizadas y se conectan mediante puentes disulfuro formando una primera región de unión; y dichas segundas cadenas pesada y ligera son completamente humanas y están conectadas a través de puentes disulfuro que forman una segunda región de unión, en donde dicha primera región de unión es según cualquier aspecto o realización descrita en la presente memoria, y dicha segunda región de unión se une a una diana diferente. En una realización, el anticuerpo comprende una primera y una segunda cadenas pesadas, una primera y segunda cadenas ligeras, en donde dichas primeras cadenas pesadas y dichas primeras cadenas ligeras se humanizan y se conectan a través puentes disulfuro formando una primera región de unión; y dichas segundas cadenas pesada y ligera son humanizadas o quiméricas y están conectadas a través de puentes disulfuro formando una segunda región de unión, en donde dicha primera región de unión es según la invención, y dicha segunda región de unión se une a un epítopo diferente de CD3 que dicha primera región de unión .

En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; una segunda región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 19, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 20; en donde al menos en una de las primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente; y en donde en la primera cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición F405 en una cadena pesada de IgG1 humana, es L, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición K409 en una cadena pesada de IgG1 humana, es R.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; una segunda región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 29, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 30; en donde al menos en una de las primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente; y en donde en la primera cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición F405 en una cadena pesada de IgG1 humana, es L, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición K409 en una cadena pesada de IgG1 humana, es R.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; una segunda región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 19, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 20; en donde tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente; y en donde en la primera cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición F405 en una cadena pesada de IgG1 humana, es L, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición K409 en una cadena pesada de IgG1 humana, es R.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 6, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 10; una segunda región de unión que comprende una secuencia VH que se expone en SEQ ID NO: 29, y una secuencia VL que se expone en SEQ ID NO: 30; en donde tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente; y en donde en la primera cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición F405 en una cadena pesada de IgG1 humana, es L, y en la segunda cadena pesada el aminoácido en la posición correspondiente a la posición K409 en una cadena pesada de IgG1 humana, es R.

El término "puentes disulfuro", como se emplea en la presente memoria, se refiere al enlace covalente entre dos residuos de cisteína, es decir, dicha interacción también se puede designar como una interacción Cys-Cys.

El término "diana", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula a la que se une la región de unión del anticuerpo según la invención. Cuando se utiliza en el contexto de la unión de un anticuerpo, el término incluye cualquier antígeno hacia el cual se dirige el anticuerpo originado.

En una realización concreta, las primeras cadenas pesadas y las primeras cadenas ligeras se humanizan y se conectan mediante puentes disulfuro que forman una primera región de unión; y las segundas cadenas pesadas y ligeras son completamente humanas y están conectadas a través de puentes disulfuro que forman una segunda región de unión, en donde la primera región de unión es según cualquier realización descrita en la presente memoria, y la segunda región de unión se une a una diana diferente; y en donde al menos en una de las primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En una realización concreta, las primeras cadenas pesadas y las primeras cadenas ligeras se humanizan y se conectan mediante puentes disulfuro que forman una primera región de unión; y las segundas cadenas pesadas y ligeras son completamente humanas y están conectadas a través de puentes disulfuro formando una segunda región de unión, en donde la primera región de unión es según cualquier realización descrita en la presente memoria, y la segunda región de unión se une a un epítopo diferente de CD3 que la primera unión región; y en donde al menos en una de las primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En una realización concreta, las primeras cadenas pesadas y las primeras cadenas ligeras se humanizan y se conectan mediante puentes disulfuro que forman una primera región de unión; y las segundas cadenas pesadas y ligeras son completamente humanas y están conectadas a través de puentes disulfuro que forman una segunda región de unión, en donde la primera región de unión es según cualquier realización descrita en la presente memoria, y la segunda región de unión se une a una diana diferente; y en donde, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

En una realización concreta, las primeras cadenas pesadas y las primeras cadenas ligeras se humanizan y se conectan mediante puentes disulfuro que forman una primera región de unión; y las segundas cadenas pesadas y ligeras son completamente humanas y están conectadas a través de puentes disulfuro que forman una segunda región de unión, en donde la primera región de unión es según cualquier realización descrita en la presente memoria, y la segunda región de unión se une a un epítopo diferente de CD3 que la primera unión región; y en donde, tanto en la primera como en la segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente.

Construcciones de ácido nucleico, vectores de expresión y células anfitrionas

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica una o más secuencias expuestas en la Tabla 1. Por lo tanto, la presente descripción se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica cualquiera de las secuencias expuestas en SEC ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.

La invención proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica secuencias de un anticuerpo contra CD3 humanizado de acuerdo con la presente invención, vectores de expresión que comprenden una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, células anfitrionas que comprenden dichos vectores de expresión y métodos para producir dicho anticuerpo mediante el cultivo de tales células anfitrionas en condiciones apropiadas mediante las cuales el anticuerpo se produce y, opcionalmente, se recupera. Los anticuerpos contra CD3 humanizados también se pueden denotar como "huCD3".

En una realización, la invención proporciona un vector de expresión que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención y (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención.

En un aspecto de la descripción, el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más de las secuencias CDR de cadena pesada y cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5; y la secuencia GTN.

En la invención, el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos VH de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos VL de SEQ ID NO: 10. El vector de expresión puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de una cadena ligera de anticuerpo humano, de una cadena pesada de anticuerpo humano, o ambas. También se proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEC ID NO: 15, 16, 23, 24, 25 y 26.

También se proporcionan secuencias de ácido nucleico diferentes de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente pero que debido a la variación del código genético codifican la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede variar, pero dar como resultado una secuencia de aminoácidos idéntica a cualquier secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria. Es bien sabido por el experto en la técnica cómo identificar tales secuencias adicionales de ácido nucleico basadas en el código genético.

En una realización adicional, el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o tanto la cadena ligera como la cadena pesada de un anticuerpo, p. ej. de un anticuerpo humano.

Tales vectores de expresión como los descritos anteriormente se pueden utilizar para la producción recombinante de anticuerpos de la invención.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluidos los vectores de ácido nucleico cromosómico, no cromosómico y sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de expresión). Los ejemplos de tales vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo contra CD3 humanizado está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en[64]), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en [65] y/o [66]), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "midge" (como se describe, por ejemplo, en [67]), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción con $CaPO_4^-$ precipitado (como se describe, por ejemplo, en [68], [69], [70] y [71]). Tales vectores de ácido nucleico y su uso son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, [72] y [73]).

En una realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo contra CD3 humanizado en una célula bacteriana. Los ejemplos de tales vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN ([74]), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares.

Un vector de expresión puede ser, también o alternativamente, un vector adecuado para su expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para su expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: [75] y [76]).

Una construcción y/o vector de ácido nucleico también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que se puede dirigir a un polipéptido, tal como una cadena de polipéptido naciente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Tales secuencias son conocidas en la técnica e incluyen péptidos señal o líder de secreción, secuencias dirigidas a orgánulos (p. ej., secuencias de localización nuclear, señales de retención en el RE, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito en los cloroplastos), secuencias de localización/anclaje de membrana (p. ej., secuencias de parada de la transferencia, secuencias de anclaje de GPI) y similares que son bien conocidas en la técnica.

En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo contra CD3 humanizado pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión adecuados. Los ejemplos de tales elementos incluyen promotores de expresión fuertes (p. ej., promotor/potenciador de IE de CMV humano, así como promotores RSV, SV40, SL3-3, MMTV y LTR de VIH),

secuencias de terminación de poli(A) eficaces, un origen de replicación para el plásmido producto en *E. coli,* un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable, y/o un sitio de clonación conveniente (p. ej., un policonector). Las construcciones y/o vectores de ácido nucleico también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la técnica reconocerá que dichos términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica en ciertas condiciones).

En una realización, el vector de expresión que codifica el anticuerpo contra CD3 humanizado se coloca en, y/o se suministra a, la célula anfitriona o animal anfitrión a través de un vector viral.

Tales vectores de expresión se pueden utilizar para la producción recombinante de anticuerpos contra CD3 humanizados.

En un aspecto, la invención proporciona una célula anfitriona que comprende un vector de expresión según la invención.

En un aspecto, los anticuerpos contra CD3 humanizados de cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria se proporcionan mediante el uso de células anfitrionas recombinantes eucarióticas, recombinantes procarióticas o recombinantes microbianas que producen el anticuerpo. Por consiguiente, la invención proporciona una célula anfitriona recombinante eucariótica, recombinante procariótica o recombinante microbiana, que produce un anticuerpo contra CD3 humanizado o inmunoglobulina de la invención. Los ejemplos de células anfitrionas incluyen células de levadura, bacterianas y de mamífero, tales como las células CHO o HEK-293. Por ejemplo, en una realización, la célula anfitriona comprende una secuencia de ácido nucleico integrada de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo contra CD3 humanizado de la invención. En otra realización, la célula anfitriona comprende una secuencia de ácido nucleico no integrada, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo contra CD3 humanizado de la invención.

Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), como se emplea en la presente memoria, se refiera a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión o una construcción o secuencia de ácido nucleico. Se debe entender que se pretende que dichos términos se refieran no solo a la célula sujeto concreta, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero incluirse aún dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se emplea en la presente memoria. Las células anfitrionas recombinantes incluyen, por ejemplo, células anfitrionas eucarióticas, tales como células CHO, células HEK-293, PER.C6, células NS0 y células linfocíticas, y células procarióticas tales como *E. coli* y otros anfitriones eucarióticos tales como las células vegetales y los hongos.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo contra CD3 humanizado de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de

a) cultivar una célula anfitriona de la invención como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, y
b) recuperar y/o purificar el anticuerpo de la invención del medio de cultivo.

En un aspecto adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de un anticuerpo contra CD3 humanizado codifica adicionalmente un segundo radical, tal como un polipéptido terapéutico. Los polipéptidos terapéuticos ilustrativos se describen en otra parte de la presente memoria. En una realización, la invención se refiere a un método para producir una proteína de fusión de anticuerpo contra CD3 humanizado, comprendiendo dicho método las etapas de

a) cultivar una célula anfitriona que comprende un vector de expresión que comprende dicha secuencia de nucleótidos, y
b) recuperar y/o purificar la proteína de fusión del anticuerpo contra CD3 humanizado del medio de cultivo.

Composiciones

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o anticuerpo biespecífico de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con otros coadyuvantes y excipientes cualesquiera conocidos de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en [77].

Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como otros adyuvantes y excipientes cualesquiera conocidos, deben ser adecuados para el anticuerpo humanizado de la presente invención y el modo de administración elegido. La idoneidad para los portadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina basándose en la falta de un impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto elegido o composición farmacéutica de la presente invención (p. ej., un impacto menor que sustancial (10% o menos de inhibición relativa, 5% o menos de inhibición relativa, etc.)) sobre la unión al antígeno.

Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizantes (p. ej., azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración concretos, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones concretas de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto concreto que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados combinados con las composiciones concretas empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier ruta y modo adecuados. Las rutas adecuadas para administrar un anticuerpo humanizado o quimérico de la presente invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la técnica.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se emplean en la presente memoria, significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen Inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital, intracardíaca intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

En una realización, esa composición farmacéutica se administra por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles con un anticuerpo humanizado de la presente invención.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o varios tampones. Otros portadores son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Cuando se hace referencia al "compuesto activo", se contempla también la referencia al anticuerpo humanizado según la presente invención.

La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes

solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más coadyuvantes apropiados para la ruta de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la efectividad de la composición farmacéutica. El anticuerpo humanizado de la presente invención se puede preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Tales portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como etileno - acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico) solo o con cera u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., [78]).

En una realización, el anticuerpo humanizado de la presente invención se puede formular para asegurar una distribución adecuada *in vivo.* Los portadores farmacéuticamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También se pueden incorporar a las composiciones otros compuestos activos o terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas para inyección deben ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej. como se enumeró anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración por esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, p. ej. de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución del mismo previamente filtrada en condiciones estériles.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración por esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución del mismo previamente filtrada en condiciones estériles.

Aplicaciones terapéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado, o composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado, o composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

El anticuerpo humanizado o la composición farmacéutica de la invención se pueden utilizar como en el tratamiento

de cualquier cáncer en el que se deseen los mecanismos efectores de las células T citotóxicas. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o quimérico se puede administrar a células en cultivo, p. ej., *in vitro* o *ex vivo* o a sujetos humanos, p. ej. *in vivo,* para tratar o prevenir trastornos como el cáncer, trastornos inflamatorios o autoinmunitarios. Como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" es típicamente un ser humano que responde al anticuerpo humanizado o quimérico, o a la composición farmacéutica. Los sujetos pueden incluir, por ejemplo, pacientes humanos que tienen trastornos que se pueden corregir o mejorar modulando una función diana o provocando la destrucción de la célula, directa o indirectamente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o una composición farmacéutica de la invención para su uso en métodos para tratar o prevenir un trastorno, tal como cáncer, en donde el reclutamiento de células T contribuiría al tratamiento o prevención, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado, o composición farmacéutica para un sujeto que lo necesita. El método típicamente implica la administración a un sujeto de un anticuerpo humanizado en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno.

En un aspecto concreto, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar el anticuerpo humanizado o composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso o el método como se define en cualquier aspecto o realización descritos en la presente memoria en donde el anticuerpo humanizado es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente tanto a CD3 como a una diana específica de cáncer, o una diana que se expresa en exceso en cáncer o asociada con cáncer, tal como HER2, CD19, EpCAM, EGFR, CD66e (o CEA, CEACAM5), CD33, EphA2 o MCSP (o HMW-MAA) y en donde la enfermedad es cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de esófago y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas, cáncer de testículo, melanoma maligno, cáncer de tejidos blandos (p. ej. , sarcoma sinovial), una forma indolente o agresiva de linfoma de células B, leucemia linfática crónica o leucemia linfática aguda.

Las dosis eficaces y los regímenes de dosificación para el anticuerpo humanizado dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden ser determinadas por los expertos en la técnica.

Un médico con conocimiento práctico normal en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico podría iniciar las dosis del anticuerpo humanizado empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la presente invención será la cantidad de anticuerpo humanizado que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico de acuerdo con un régimen de dosificación concreto. Tal dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente.

Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para uso terapéutico se puede medir por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede, por ejemplo, evaluar en un sistema modelo animal que prediga la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del anticuerpo humanizado para inhibir el crecimiento celular o para inducir citotoxicidad por medio de ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico, es decir, un anticuerpo humanizado terapéutico, o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto normal en la técnica podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración concretas seleccionadas.

Un intervalo ilustrativo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado de la invención es de aproximadamente 0,001-30 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-10 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-5 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,001-2 mg/kg, tal como aproximadamente 0,001-1 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 15, aproximadamente 18 mg/kg.

La administración puede ser, p. ej. intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y, por ejemplo, se puede administrar próxima al sitio de la diana.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis

proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

En una realización, la eficacia del tratamiento se controla durante la terapia, p. ej. en puntos predefinidos en el tiempo.

Si se desea, se puede administrar una dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. En otra realización, el anticuerpo humanizado, o la composición farmacéutica, se administran mediante infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para minimizar cualquier efecto secundario no deseado.

Si bien es posible que un anticuerpo humanizado de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el anticuerpo humanizado en forma de una composición farmacéutica como se describió anteriormente.

También se puede administrar una dosis eficaz de un anticuerpo humanizado de la invención utilizando un período de dosificación semanal, quincenal o cada tres semanas. El período de dosificación se puede restringir, por ejemplo, a 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido la progresión clínica. Alternativamente, se puede administrar una dosis eficaz de un anticuerpo humanizado de la invención cada dos, tres o cuatro semanas.

En una realización, el anticuerpo humanizado se puede administrar mediante infusión a una dosis semanal calculada en mg/m^2. Tales dosis se pueden basar, por ejemplo, en las dosificaciones en mg/kg proporcionadas anteriormente de acuerdo con lo siguiente: dosis (mg/kg) x 70: 1,8. Tal administración se puede repetir, p. ej., 1 a 8 veces, tal como 3 a 5 veces. La administración se puede realizar mediante infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. En una realización, el anticuerpo humanizado se puede administrar mediante infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

En una realización, el anticuerpo humanizado se puede administrar a una dosificación semanal calculada como una dosis fija hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces cuando se administra una vez a la semana. Tal régimen se puede repetir una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. Tales dosis fijas se pueden basar, por ejemplo, en las dosis en mg/kg proporcionadas anteriormente, con una estimación de peso corporal de 70 kg. La dosificación se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de anticuerpo humanizado de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo, tomando una muestra biológica y utilizando anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a la región de unión de los anticuerpos humanizados de la presente invención.

En una realización, el anticuerpo humanizado se puede administrar mediante terapia de mantenimiento, tal como, p. ej., una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

Un anticuerpo humanizado también se puede administrar profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de un evento en la progresión del cáncer y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando un cáncer está en remisión.

Las composiciones parenterales se pueden formular en una forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se emplea en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la presente invención está dictada por, y depende directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición tales como el compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un anticuerpo humanizado también se puede administrar profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de un evento en la progresión del cáncer y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando un cáncer está en remisión. Esto puede ser especialmente útil en pacientes en los que es difícil localizar un tumor que se sabe que está presente debido a otros factores biológicos.

Aplicaciones de diagnóstico

El anticuerpo humanizado de la invención también se puede utilizar con fines de diagnóstico, utilizando una composición que comprende un anticuerpo humanizado. Tales métodos y composiciones se pueden utilizar con fines puramente diagnósticos, tales como la detección o identificación de una enfermedad, así como para verificar el progreso de los tratamientos terapéuticos, verificar la progresión de la enfermedad, evaluar el estado después del tratamiento, verificar la recurrencia de la enfermedad, evaluar el riesgo de desarrollar una enfermedad y similares.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad caracterizada por la implicación o acumulación de células de expresión de CD3, que comprende administrar el anticuerpo humanizado o quimérico según la descripción, la composición según la descripción o la composición farmacéutica según a la descripción a un sujeto, opcionalmente en donde dicho anticuerpo humanizado o quimérico está marcado con un agente detectable.

En un aspecto, el anticuerpo humanizado de la presente invención se utiliza ex *vivo*, tal como en el diagnóstico de una enfermedad en la que las células que expresan una diana específica de interés y a las que se une el anticuerpo humanizado, son indicativas de enfermedad o están involucradas en la patogénesis, detectando niveles de la diana o niveles de células que expresan la diana de interés sobre su superficie celular en una muestra tomada de un paciente. Esto se puede lograr, por ejemplo, poniendo en contacto la muestra que se va a someter a ensayo, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a la diana. A continuación, se puede detectar la formación de complejos (p. ej., utilizando un ELISA). Cuando se utiliza una muestra de control junto con la muestra de prueba, se analiza el nivel de anticuerpo humanizado o complejo de anticuerpo-diana en ambas muestras y un nivel estadísticamente significativo más alto de anticuerpo humanizado o complejo de anticuerpo-diana en la muestra de prueba indica un nivel más alto de la diana en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control.

Los ejemplos de inmunoensayos convencionales en los que se pueden utilizar los anticuerpos humanizados de la presente invención incluyen, sin limitación, ensayos ELISA, RIA, FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica tisular, transferencia Western y/o inmunoprecipitación.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad caracterizada por la implicación o acumulación de células que expresan CD3, que comprende administrar un anticuerpo, anticuerpo biespecífico, composición o composición farmacéutica a un sujeto, opcionalmente en donde el anticuerpo está marcado con una marca detectable

En una realización, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de una diana, o una célula que expresa la diana, en una muestra que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo humanizado de la invención en condiciones que permitan la unión del anticuerpo humanizado a la diana en la muestra; y
- analizar si se ha formado un complejo. Típicamente, la muestra es una muestra biológica.

En una realización, la muestra es una muestra de tejido que se sabe o se sospecha que contiene una diana específica y/o células que expresan la diana. Por ejemplo, la detección *in situ* de la expresión de la diana se puede llevar a cabo retirando una muestra histológica de un paciente y proporcionando el anticuerpo humanizado de la presente invención a dicha muestra. El anticuerpo humanizado se puede proporcionar aplicando o superponiendo el anticuerpo humanizado a la muestra, que después se detecta utilizando medios adecuados. A continuación, es posible determinar no solo la presencia de la diana o las células que expresan la diana, sino también la distribución de la diana o las células que expresan la diana en el tejido examinado (p. ej., en el contexto de la evaluación de la propagación de las células cancerosas). Utilizando la presente invención, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que se puede modificar cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) para lograr tal detección *in situ*.
En los ensayos anteriores, el anticuerpo humanizado se puede marcar con una sustancia detectable para permitir que se detecte el anticuerpo unido. Alternativamente, el anticuerpo humanizado específico (primario) unido puede ser detectado por un anticuerpo que está marcado con una sustancia detectable y que se une al anticuerpo humanizado específico primario. Además, en los ensayos anteriores, se puede utilizar una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo o anticuerpo biespecífico según la invención.

El nivel de diana en una muestra también se puede estimar mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones diana marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo humanizado específico de la diana no marcado. En este tipo de ensayo, la muestra biológica, el patrón o los patrones diana marcados y el anticuerpo humanizado específico de la diana se combinan, y se determina la cantidad del patrón diana marcado unido al anticuerpo humanizado específico de la diana no marcado. La cantidad de diana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón diana marcado unido al anticuerpo humanizado específico de la diana.

Las marcas adecuadas para el anticuerpo humanizado específico de la diana, el anticuerpo secundario y/o el patrón diana utilizados en técnicas de diagnóstico *in vitro* incluyen, sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina,

diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S y ^{3}H.

En un aspecto, el anticuerpo humanizado específico de la diana de la invención se utiliza en la obtención de imágenes *in vivo* de tejidos que expresan la diana, tales como los tumores. Para los métodos *in vivo*, son particularmente ventajosos los fragmentos de anticuerpos tales como, p. ej., los fragmentos $(Fab')_2$, Fab y Fab' debido a su rápida cinética de distribución.

La obtención de imágenes *in vivo* se puede realizar por cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo humanizado o quimérico específico de la diana (p. ej., un anticuerpo o un fragmento) marcado con ^{99}Tc ^{131}I, ^{111}In u otro isótopo emisor de rayos gamma para obtener imágenes de la acumulación o distribución de anticuerpos específicos de la diana en tejidos que expresan la diana, tales como tumores con una cámara de centelleo gamma (p. ej., un dispositivo Elscint Apex 409ECT), que generalmente utiliza un colimador de baja energía, alta resolución o un colimador multiuso de baja energía. Alternativamente, se puede utilizar el marcaje con ^{89}Zr, ^{76}Br, ^{18}F u otro radionúclido emisor de positrones para obtener imágenes de anticuerpos humanizados o quiméricos específicos de la diana, o la distribución de fragmentos de anticuerpos en tumores utilizando la tomografía por emisión de positrones (PET). Las imágenes obtenidas mediante el uso de tales técnicas se pueden utilizar para evaluar la biodistribución de la diana en un paciente, mamífero o tejido, por ejemplo, en el contexto de la utilización de la diana como un biomarcador para determinar la presencia de células cancerosas/tumorales. Las variaciones en esta técnica pueden incluir el uso de imágenes de resonancia magnética (MRI) para mejorar las imágenes sobre las técnicas con cámara gamma. Los métodos y principios convencionales de la inmunoescintigrafía se describen, por ejemplo, en [79], [80] y [81]. Por otra parte, tales imágenes también, o alternativamente, pueden servir como base para técnicas quirúrgicas para extirpar tumores. Además, tales técnicas de obtención de imágenes *in vivo* pueden permitir la identificación y localización de un tumor en una situación en la que se identifica que un paciente tiene un tumor (debido a la presencia de otros biomarcadores, metástasis, etc.), pero el tumor no se puede identificar mediante técnicas analíticas tradicionales.

Los métodos de obtención de imágenes *in vivo* y otros métodos de diagnóstico son particularmente útiles en la detección de micrometástasis en un paciente humano (p. ej., un paciente no diagnosticado previamente con cáncer o un paciente en un período de recuperación/remisión de un cáncer).

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método de obtención de imágenes *in vivo* en donde un anticuerpo humanizado o quimérico específico de la diana de la presente descripción se conjuga con un agente radiopaco que promueve la detección, el anticuerpo humanizado o quimérico conjugado se administra a un anfitrión, por ejemplo mediante inyección en el torrente sanguíneo, y se somete a ensayo la presencia y la ubicación del anticuerpo humanizado o quimérico marcado en el anfitrión. Mediante esta técnica y cualquier otro método de diagnóstico proporcionado en la presente memoria, la presente descripción proporciona un método para escrutar la presencia de células relacionadas con la enfermedad en un paciente humano o una muestra biológica tomada de un paciente humano y/o para evaluar la distribución del anticuerpo humanizado o quimérico específico de la diana antes de la terapia con ADC específico de la diana.

Para el diagnóstico por imagen, los radioisótopos se pueden unir a un anticuerpo humanizado o quimérico específico de la diana, ya sea directa o indirectamente, utilizando un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermedios útiles incluyen quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriaminopentaacético (véase, por ejemplo, [82]). Además de los radioisótopos y los agentes radiopacos, los métodos de diagnóstico se pueden realizar utilizando anticuerpos específicos de la diana que se conjugan con colorantes (por ejemplo con el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes potenciadores (p. ej., iones paramagnéticos) para obtener imágenes de resonancia magnética (IRM) (véase, p. ej., [83], que describe las técnicas de IRM y la preparación de anticuerpos conjugados con un agente potenciador de IRM). Tales agentes de diagnóstico/detección se pueden seleccionar entre agentes para el uso en IRM y compuestos fluorescentes. Para cargar un anticuerpo humanizado o quimérico específico de la diana con metales radioactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tiene una cola larga a la que se anclan una multiplicidad de grupos quelantes para unir los iones. Tal cola puede ser un polímero tal como una polilisina, un polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tenga grupos colgantes a los que pueden estar unidos grupos quelantes tales como, p. ej., porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares conocidos. por ser útiles para este propósito. Los quelatos se pueden acoplar a anticuerpos humanizados o quiméricos específicos de la diana utilizando productos químicos convencionales.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona un anticuerpo quimérico o humanizado específico de la diana de diagnóstico, en donde el anticuerpo quimérico o humanizado específico de la diana se conjuga con un agente de contraste (por ejemplo para la obtención de imágenes por resonancia magnética, tomografía computarizada o agente potenciador de contraste de ultrasonido) o un radionúclido que puede ser, por ejemplo, un isótopo emisor de electrones gamma, beta, alfa, Auger, o positrones.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con la descripción.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para detectar la presencia de antígeno diana o una célula que expresa la diana, en una muestra, que comprende:

- un anticuerpo humanizado específico de la diana de la invención; e
- instrucciones de uso del kit.

Específicamente, la presente invención proporciona un kit para detectar la presencia de un antígeno CD3, o una célula que expresa CD3, en una muestra que comprende las etapas de;

a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo o anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o anticuerpo biespecífico y CD3; y
b) analizar si se ha formado un complejo.

En una realización, la presente invención proporciona un kit para el diagnóstico del cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo humanizado específico de la diana de la invención, y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo humanizado específico de la diana a la diana. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas u otras etiquetas detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede ser visualizado. En una realización, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende uno o más anticuerpos humanizados específicos de la diana de la presente invención en forma marcada o sin marcar en uno o varios recipientes adecuados, reactivos para las incubaciones para un ensayo indirecto y sustratos o agentes de derivatización para la detección en tal ensayo, dependiendo de la naturaleza de la marca. También se pueden incluir reactivos de control e instrucciones de uso.

Los kits de diagnóstico también se pueden suministrar para su uso con un anticuerpo humanizado específico de la diana, tal como un anticuerpo específico de la diana marcado, para la detección de la presencia de la diana en una muestra de tejido o anfitrión. En tales kits de diagnóstico, así como en los kits para usos terapéuticos descritos en otra parte de la presente memoria, un anticuerpo humanizado específico de la diana típicamente se puede proporcionar en forma liofilizada en un recipiente, solo o junto con anticuerpos adicionales específicos para una célula o péptido diana. Típicamente, también se incluyen un portador farmacéuticamente aceptable (p. ej., un diluyente inerte) y/o componentes del mismo, tales como un tampón Tris, fosfato o carbonato, estabilizadores, conservantes, biocidas, proteínas inertes, p. ej., albúmina sérica o similares (generalmente en un recipiente separado para mezclar) y reactivos adicionales (también generalmente en recipientes separados). En ciertos kits, también se incluye un anticuerpo secundario capaz de unirse al anticuerpo humanizado específico de la diana, que típicamente está presente en un recipiente separado. El segundo anticuerpo típicamente se conjuga con una marca y se formula de una manera similar al anticuerpo humanizado específico de la diana de la presente invención. Utilizando los métodos descritos anteriormente y en otra parte de la presente memoria, se pueden utilizar los anticuerpos humanizados específicos de la diana para definir subconjuntos de células cancerosas/tumorales y caracterizar tales células y tejidos tumorales relacionados.

Secuencias

Tabla 1

SEQ ID NO:	**Nombre del clon**	**Secuencia**
SEQ ID NO: 1	CDR1 de VH de huCD3	GFTFNTYA
SEQ ID NO: 2	CDR2 de VH de huCD3	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO: 3	CDR3 de VH de huCD3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 4	CDR1 de VL de huCD3	TGAVTTSNY
	CDR2 de VL de huCD3	GTN
SEQ ID NO: 5	CDR3 de VL de huCD3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO: 6	VH1 de huCD3	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS

SEQ ID NO:	Nombre del clon	Secuencia
SEQ ID NO:7	VH2 de huCD3	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:8	VH3 de huCD3	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:9	VH4 de huCD3	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA
		PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTM VTVSS
SEQ ID NO:10	VL1 de huCD3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:11	VL2 de huCD3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:12	VL3 de huCD3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:13	CD3ε (épsilon) humana madura	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHN DKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLL LLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPN PDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:14	CD3δ (delta) humano	FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRI LDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA GIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQ VYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK

SEQ ID NO:	Nombre del clon	Secuencia
SEQ ID NO:15	Región constante de cadena pesada de IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
SEQ ID NO:16	Región constante de cadena pesada de IgG1m(f)-LFLEDA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:17	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLE WVATISRYSRYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRPLYGSSPDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:18	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYD TSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPLTFGS GTKLEMR
SEQ ID NO:19	VH HER2 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLE WMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:20	VL HER2 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRT
		FGQGTKVEIK
SEQ ID NO:21	CD3ε (épsilon) de cino madura	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKE DSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENC MEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:22	CD3ε (épsilon) de rhesus madura	QDGNEEMGSITQTPYHVSISGTTVILTCSQHLGSEVQWQHNGKNKE DSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENC MEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI

SEQ ID NO:	Nombre del clon	Secuencia
SEQ ID NO:23	IgG1m(f)-F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:24	IgG1m(f)-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:25	IgG1m(f)-LFLEDA-F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:26	IgG1m(f)-LFLEDA-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:27	VH murina parental	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSC AASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSQSILYLQMNNL KTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSA
SEQ ID NO:28	VL murina parental	QAVVTQESALTTSPGETVTLTC RSSTGAVTTSNYANWVQEKPDH LFTGLIGGTNKRAPGVPARFSG SLIGDKAALTITGAQTEDEAIY FCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:29	VH CD20 - 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDYAMHWVRQA PGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Nombre del clon	Secuencia
SEQ ID NO:30	VL CD20 - 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG
		QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos contra CD3 humanizados y variantes de anticuerpos no activadoras.

Humanización de anticuerpos contra CD3

La humanización de un anticuerpo contra CD3 murino (documento US 8.236.308, descrita aquí como IgG1-CD3) fue realizada por Antitope (Cambridge, Reino Unido) utilizando su versión mejorada de la tecnología de humanización de la línea germinal (injerto de CDR) (documento EP 0 629 240). Utilizando esta tecnología, se diseñaron 4 cadenas VH diferentes (SEQ ID NO: 6, 7, 8 y 9) y 3 cadenas VL diferentes (SEQ ID NO: 10, 11 y 12). Al combinar estas 4 VH con las 3 cadenas VL, se generaron 12 anticuerpos diferentes. Las variantes humanizadas se describen en la presente memoria como huCD3. Por lo tanto, las variantes humanizadas que comprenden un VH y un VL según la invención, se describen como, por ejemplo, IgG1-huCD3-H1L1, lo que significa que dicha variante específica es del isotipo IgG1, es un CD3 humanizado y comprende la secuencia de aminoácidos VH denominada "H1" y se define de acuerdo con SEQ ID NO: 6, y la secuencia de aminoácidos de VL se denomina "L1" y se define de acuerdo con SEQ ID NO: 10. Por lo tanto, H1 se refiere a la región variable de cadena pesada VH1, L1 se refiere a la región variable de cadena ligera VL1, y así sucesivamente.

En particular, las variantes IgG1-huCD3-H1L1 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH1 expuesta en SEQ ID NO: 6 y la secuencia VL1 expuesta en SEQ ID NO: 10), IgG1-huCD3-H1L2 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH1 expuesta en SEQ ID NO: 6 y la secuencia VL2 expuesta en SEQ ID NO: 11), IgG1-huCD3-H1L3 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH1 expuesta en SEQ ID NO: 6 y la secuencia VL3 expuesta en SEQ ID NO: 12), IgG1-huCD3-H3L3 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH3 expuesta en SEQ ID NO: 8 y la secuencia VL3 expuesta en SEQ ID NO: 12), IgG1-huCD3-H4L1 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH4 expuesta en SEQ ID NO: 9 y la secuencia VL1 expuesta en SEQ ID NO: 10), IgG1-huCD3-H3L1 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH3 expuesta en SEQ ID NO: 8 y la secuencia VL1 expuesta en SEQ ID NO: 10), IgG1-huCD3-H3L3 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH3 expuesta en SEQ ID NO: 8 y la secuencia VL3 expuesta en SEQ ID NO: 12), e IgG1-huCD3-H4L3 (CD3 humanizado que comprende la secuencia VH4 expuesta en SEQ ID NO: 9 y la secuencia VL3 expuesta en SEQ ID NO: 12) se han generado y probado en los ejemplos descritos en la presente memoria.

En algunos ejemplos, se utilizó un anticuerpo que comprendía las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de huCLB-T3/4 (SEC ID NO: 17 y 18, respectivamente) como anticuerpo de control (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50) y para verificar diferentes combinaciones de mutaciones no activadores en la región Fc (véanse los ejemplos 8 a 10). El huCBL-T3/4 es una versión humanizada del anticuerpo murino CD3 CLB-T3/4 (Parren y col., Res Immunol. 1991, 142 (9):749-63). Ambas secuencias (SEQ ID NO: 17 y 18) se clonaron en los vectores de expresión pcDNA3.3 (Invitrogen) relevantes y se expresaron mediante co-transfección en células HEK293F. El anticuerpo de control resultante se describe como IgG1-huCLB-T3/4.

En algunos ejemplos, se utilizó como control positivo un anticuerpo que comprendía las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo contra CD20 7D8 (SEQ ID NO: 29 correspondiente a la secuencia VH y SEQ ID NO: 30 correspondiente a la secuencia VL). Cuando se utiliza en el contexto de un control positivo, se denomina "IgG1-CD20".

Estos anticuerpos IgG1-CD3 (es decir, el anticuerpo quimérico, parental CD3), IgG1-huCD3 e IgG1-huCLB-T3/4 se utilizaron en formato monoespecífico y biespecífico, donde los anticuerpos biespecíficos se generaron como se describe a continuación.

Anticuerpo para HER2

En algunos de los ejemplos se utilizó un anticuerpo contra HER2. Las secuencias VH y VL para este anticuerpo específico para HER2 (anticuerpo 169, SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente) se describieron anteriormente (documento WO2012/143524 [Genmab]; Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50) El anticuerpo se utilizó en

formatos monoespecíficos y biespecíficos, y se denomina "IgG1-HER2".

anticuerpo b12

En algunos de los ejemplos, el anticuerpo b12, un anticuerpo específico de gp120 (Barbas, CF. J Mol Biol. 5 de abril de 1993; 230(3):812-23.) se utilizó como control negativo y se denomina "IgG1-b12".

Expresión

Los anticuerpos se expresaron como IgG1,κ o IgG1,λ con o sin las mutaciones no activadoras descritas a continuación y con una mutación en el dominio CH3 que permite la generación de anticuerpos biespecíficos mediante el método descrito a continuación: IgG1-HER2-K409R, IgG1-b12 -K409R, IgG1-CD3-F405L. Las mezclas de ADN plasmídico que codifican tanto la cadena pesada como la cadena ligera de anticuerpos se transfectaron transitoriamente a células HEK293F Freestyle (Invitrogen, EE.UU.) utilizando 293fectina (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente como describe el fabricante.

Purificación de anticuerpos.

El sobrenadante de cultivo se filtró sobre filtros de final ciego de 0,2 µm, se cargó en columnas MabSelect SuRe de 5 mL (GE Health Care) y se eluyó con citrato de sodio NaOH 0,1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se sometió a diálisis durante la noche a NaH2PO4 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Alternativamente, después de la purificación, el eluato se cargó en una columna de Desalinización HiPrep y el anticuerpo se intercambió en NaH2PO4 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis o el intercambio de tampón, las muestras se sometieron a filtración en condiciones estériles sobre filtros de final ciego de 0,2 µm. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración se midió mediante absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos purificados se almacenaron a 2-8°C.

Generación de anticuerpos biespecíficos.

Los anticuerpos biespecíficos se generaron in vitro utilizando la tecnología de la plataforma DuoBody®, es decir, intercambio de brazo Fab inducido por 2-MEA como describen el documento WO 2011/147986 y Labrijn et al. (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50; Gramer et al., MAbs 2013, 5: 962-973). Para permitir la producción de anticuerpos biespecíficos por este método, se generaron moléculas de IgG1 que portan una sola mutación en el dominio CH3: en un anticuerpo parental IgG1, la mutación F405L (es decir, el anticuerpo IgG1-CD3), en el otro anticuerpo parental IgG1, la mutación K409R (es decir, los anticuerpos HER2 o b12). Para generar anticuerpos biespecíficos, estos dos anticuerpos parentales, cada anticuerpo a una concentración final de 0,5 mg/mL, se incubaron con 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) 25 o 75 mM en un volumen total de 500 µL de TE a 31°C durante 5 horas. La reacción de reducción se detuvo cuando se eliminó el agente reductor 2-MEA utilizando columnas PD-10 (GE-healthcare, Núm. de producto 17-0851-01), equilibradas con 25 mL de PBS. Antes de la desalinización, se añadieron 2 mL de PBS (B. Braun, Núm. de producto 3623140) a las muestras para ajustar el volumen a 2,5 mL. La elución se realizó en 3,5 mL de PBS. Las muestras fueron recolectadas en unidades centrífugas Amicon Ultra (30 kD MWCO, Millipore, Núm. de producto UFC803096) y concentradas por centrifugación 8 min a 3000x *g.* Los volúmenes se ajustaron a 500 µL (cuando fue necesario) con PBS y las muestras se filtraron en condiciones estériles sobre un filtro de 0,2 µm (Millex-GV, Núm. de producto SLGV004SL). Los productos biespecíficos se almacenaron a 2-8°C.

De manera alternativa, produciendo el mismo anticuerpo biespecífico, para generar anticuerpos biespecíficos, se mezclaron 100 µg de los dos anticuerpos parentales y se incubaron con 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) 75 mM en un volumen total de 400 µL de PBS (B. Braun, Núm. de producto 3623140) a 31°C durante 5 horas. La reacción de reducción se detuvo cuando se eliminó el agente reductor 2-MEA utilizando unidades centrífugas Amicon Ultra de 0,5 mL (MWCO 10 kD, Millipore, Núm. de producto UFC501096) y se lavó 4 veces con 400 µl de PBS mediante centrifugación 10 min a 13000x g. Las muestras se recogieron en un tubo nuevo invirtiendo el filtro y centrifugando 2 min a 1000 g. Los volúmenes se ajustaron a 200 µL (cuando fue necesario) con PBS. Se midió la absorbancia de 280 nm (A280) de productos biespecíficos para determinar la concentración final. Cromatografía de intercambio catiónico por HPLC (HPLC-CEX) (como se describe en el documento WO 2013/060867) se realizó para determinar la cantidad de producto biespecífico. Las muestras se almacenaron a 2-8°C.

Los anticuerpos biespecíficos generados se describen como "esqueleto de IgG1 K409R" y "esqueleto de IgG1 F405L" a continuación.

Mutaciones no activadoras

Se generaron varias variantes de anticuerpos con una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc. Una región Fc no activadora evita que el anticuerpo interactúe con los receptores Fc presentes en las células

sanguíneas, como los monocitos, o con C1q para activar la vía clásica del complemento. La reducción de la actividad Fc se probó en variantes de anticuerpos que contienen diferentes combinaciones de sustituciones de aminoácidos en la región Fc. Se introdujeron un máximo de cinco sustituciones de aminoácidos, que incluyen las mutaciones N297Q, L234A, L235A, L234F, L235E, D265A y P331S. Se introdujeron sustituciones en una o más de estas cinco posiciones de aminoácidos en la cadena principal de IgG1 K409R y/o F405L. Se generaron las siguientes variantes de la región Fc del anticuerpo huCLB-T3/4: N297Q (se refiere a la sustitución N297Q, denominada IgG1-huCLB-T3/4-N297Q), LFLE (se refiere a las sustituciones L234F/L235E, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-LFLE), LALA (se refiere a las sustituciones L234A/L235A, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-LALA), LFLENQ (se refiere a las sustituciones L234F/L235E/N297Q, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ), LFLEDA (se refiere a las sustituciones L234F/L235E/D265A, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA), DA (se refiere a la sustitución D265A, denominada IgG1-huCLB-T3/4-DA), DAPS (se refiere a las sustituciones D265A/P331S, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-DAPS), DANQ (se refiere a las sustituciones D265A/N297Q, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-DANQ), LFLEPS (se refiere a L234F/L235E/P331S sustituciones, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS), y LFLEDANQPS (se refiere a las sustituciones L234F/L235E/D265A/N297Q/P331S, denominadas IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS).

En particular, en las variantes del anticuerpo IgG1-huCD3, se introdujo una combinación de tres sustituciones de aminoácidos, que incluyen las mutaciones L234F, L235E y D265A y se conoce como LFLEDA, en las cadenas principales de IgG1 K409R y F405L para generar anticuerpos con una región Fc no activadora. La variante de anticuerpo no activadora resultante se designa con el sufijo "-LFLEDA".

Ejemplo 2 - Unión de anticuerpos contra CD3 humanizados y variantes no activadoras de los mismos a líneas de células T humanas y de cinomolgo que expresan CD3

La unión de variantes purificadas de anticuerpos contra CD3 humanizados (huCD3) y moléculas biespecíficas (bs)IgG1-huCD3 x HER2 con o sin mutaciones LFLEDA en la región Fc (véase el Ejemplo 1) a la línea de células T humanas Jurkat (Clon E6-1, ATCC® TIB-152™, LGC Standards GmbH, Wesel, Alemania) o a la línea de células T de cinomolgo HSC-F (Núm. de catálogo JCRB1164; Banco de Recursos de Investigación en Ciencias de la Salud, Osaka, Japón) se analizaron mediante análisis FACS. Además de las mutaciones no activadoras, LFLEDA, las variantes de anticuerpos contenían mutaciones F405L o K409R como se describe en el Ejemplo 1.

Se incubaron células ($1x10^5$ células/pocillo) en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (Greiner bio-one 650101) con diluciones seriadas de preparaciones de anticuerpos (intervalo 5 a 10.000 ng/mL en diluciones 1:3 veces) en 100 µL PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% a 4°C durante 30 min.

Después de lavar dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, las células se incubaron en 100 µL con anticuerpo secundario a 4°C durante 30 minutos. Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-F(ab')2 de IgG humano de cabra conjugado con R-ficoeritrina (PE) (109-116-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) diluido 1/100 en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% para todos los experimentos. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%, se resuspendieron en 150 µL de PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se analizaron en un FACS Canto II (BD Biosciences). Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

La **Figura 1A** muestra que la unión a las células Jurkat de las variantes de IgG1λ-huCD3 IgG1-huCD3-H1L1 (SEQ ID NO: 6 y 10, respectivamente), IgG1-huCD3-H1L2 (SEQ ID NO: 6 y 11, respectivamente), IgG1-huCD3- H1L3 (SEQ ID NO: 6 y 12, respectivamente), IgG1-huCD3-H3L3 (SEQ ID NO: 8 y 12, respectivamente) e IgG1-huCD3-H4L1 (SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente) con la región Fc de tipo salvaje se observó para todas las variantes, y que capacidad de unión de IgG1-CD3-LFLEDA (anticuerpo contra CD3 parental como se describe en el Ejemplo 1 con mutaciones LFLEDA no activadoras) e IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA con mutaciones LFLEDA no activadoras fue similar a las variantes de huCD3 con regiones Fc de tipo salvaje. La unión de IgG1-huCLB-T3/4, incluida como control positivo, fue fuerte para las células Jurkat en comparación con las variantes de IgG1-huCD3. No se observó unión para el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

La **Figura 6A** muestra que la unión a células Jurkat de IgG1-CD3-LFLEDA (anticuerpo contra CD3 parental como se describe en el Ejemplo 1 con mutaciones LFLEDA no activadoras), IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA, IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA e IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA con las mutaciones LFLEDA no activadoras fue similar a la capacidad de unión a las variantes de huCD3 con regiones Fc de tipo salvaje. La unión de IgG1-huCLB-T3/4, incluido como control positivo, fue más fuerte para las células Jurkat en comparación con las variantes de IgG1-huCD3 a bajas concentraciones de anticuerpos, pero similar a concentraciones de anticuerpos más altas. En general, las variantes para CD3 humanizadas han mantenido la capacidad de unión a CD3 como anticuerpo IgG1-CD3. No se observó unión para el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

La **Figura 1B** muestra que las variantes de anticuerpos biespecíficos bsIgG1 CD3 x HER2, bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA y bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA también se unen a las células Jurkat. Los valores de unión máximos para estos anticuerpos biespecíficos son más altos que los valores de unión máximos de los anticuerpos monoespecíficos. Las concentraciones de CE50 de los anticuerpos biespecíficos fueron de 6 a 10 veces mayores. Nuevamente, no se observó unión para el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

La **Figura 6B** muestra que las variantes de anticuerpos Fc biespecíficos no activadores bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, y bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA también se unen a las células Jurkat. Los valores de unión máximos para estos anticuerpos biespecíficos son más altos que los valores de unión máximos de los anticuerpos monoespecíficos. Las concentraciones de CE50 de los anticuerpos biespecíficos fueron de 4 a 10 veces mayores. La unión monovalente permite que se acumulen más anticuerpos en la superficie celular, por lo tanto, los valores de unión más altos para los anticuerpos biespecíficos. Nuevamente, no se observó unión para el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

La **Figura 2A** muestra que la unión de las variantes de IgG1-huCD3 IgG1-huCD3-H1L1, IgG1-huCD3-H1L2, IgG1-huCD3-H1L3, IgG1-huCD3-H3L3 e IgG1-huCD3-H4L1 con la región Fc de tipo salvaje e IgG1-CD3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA a HSC-F de la línea de células T de cinomolgo fue similar. No se observó unión para el anticuerpo de control huCLB-T3/4, que no reacciona de forma cruzada con CD3 de cinomolgo, y el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

La **Figura 7A** muestra que la unión de las variantes de IgG1-huCD3 IgG1-CD3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA3, IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA, e IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA a la línea de células T cinomolgo HSC-F fue similar. No se observó unión para el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

La **Figura 2B** muestra que las variantes de anticuerpos biespecíficos bsIgG1 CD3 x HER2 y bsIgG1 huCD3-H3L1-LFLEDA también se unen a las células HSC-F. Los valores de unión máximos para estos anticuerpos biespecíficos son más altos que los valores de unión máximos de las variantes anti-CD3 monoespecíficas. Las concentraciones de CE50 de los anticuerpos biespecíficos fueron de 10 a 12 veces más altas que las de los anticuerpos monoespecíficos anti-CD3. De nuevo, no se observó unión para el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

La **Figura 7B** muestra que las variantes de anticuerpos Fc biespecíficos no activadores bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, y bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA también se unen a las células HSC-F. Los valores de unión máximos para estos anticuerpos biespecíficos son más altos que los valores de unión máximos de las variantes anti-CD3 monoespecíficas. Las concentraciones de CE50 de los anticuerpos biespecíficos fueron de 3 a 6 veces más altas que las de los anticuerpos monoespecíficos anti-huCD3. De nuevo, no se observó unión para el anticuerpo de control negativo IgG1-b12.

Ejemplo 3 - Activación de células T por variantes de anticuerpos contra CD3 humanizados

La expresión de CD69 es un marcador temprano de activación de células T. Los anticuerpos contra CD3 podrían mediar el entrecruzamiento de las células T y las células inmunitarias a través de la unión de CD3 expresada por las células T y los receptores Fc expresados por las células inmunitarias por la región Fc del anticuerpo, tal como la región Fc de IgG1. Esto podría conducir a la activación de células T y a la inducción de CD69. Las variantes de anticuerpos que contienen una región Fc no activadora (mutaciones LFLEDA) no se unen a los receptores Fc. Por lo tanto, se anticipó que los anticuerpos contra CD3 no activadores no inducen la activación de las células T y la expresión de CD69 ya que la región Fc no activadora no se une a las células inmunitarias que expresan el receptor Fc y, por lo tanto, no pueden entrecruzar las células T y las células inmunitarias.

La expresión de CD69 en las células T se evaluó mediante análisis FACS para determinar la activación temprana de las células T después de la incubación con variantes humanizadas de CD3 (huCD3) con y sin mutaciones LFLEDA en la región Fc. Además de las mutaciones no activadoras, las variantes LFLEDA contienen mutaciones F405L o K409R como se describe en el Ejemplo 1.

Las PBMC se aislaron a partir de sangre completa o de la capa leucocitaria mediante separación por gradiente de densidad utilizando tubos Leucosep (núm. 227290; Greiner Bio-one, Alphen a/d Rijn, Países Bajos), se lavaron con PBS y se volvieron a suspender en medio de cultivo.

Se preparó una serie de respuesta a la dosis de variantes de anticuerpos contra huCD3, un control negativo (IgG1-b12) y controles positivos (IgE-huCD3 e IgG1-CD3 parental) en medio de cultivo (que oscilaba de 0,1 a 1.000 ng/mL en diluciones de 1:10) y se añadieron a los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos que contenía PBMC humanas o de cinomolgo. Después de 16-24 horas de incubación, las células se sedimentaron por

centrifugación y se recogió el sobrenadante (que contenía citocinas) y se almacenó a -20°C. A continuación, se lavaron las células con PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se tiñeron durante 30 minutos a 4°C con un anti-CD28-PE humano de ratón (854.222.010; Sanquin, Amsterdam, Países Bajos; marcador de células T) y anticuerpo anti-CD69-APC humano de ratón (340560; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), que presentan reactividad cruzada con CD28 y CD69 de cinomolgo, respectivamente. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando dos veces con PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%. Las células se resuspendieron en 150 µl/pocillo y se midió la expresión de CD69 en células positivas para CD28 en FACS Canto II (BD Biosciences).

La **Figura 3** muestra que IgG1-CD3 (como se describe en el Ejemplo 1) y las variantes de IgG1-huCD3 humanizadas con la región Fc de IgG1 de tipo salvaje indujeron niveles similares de expresión de CD69 en células T de origen humano (**Figura 3A**) y de cinomolgo (**Figura 3B**). Las variantes IgG1-CD3-LFLEDA e IgG1-huCD3-H3L1 no activadoras (LFLEDA) indujeron bajos niveles de expresión de CD69 en células T humanas. No se indujo expresión de CD69 mediante las variantes de IgG1-huCD3 no activadoras en las células T de cinomolgo. El anticuerpo de control IgG1-b12 tampoco indujo la expresión de CD69 en células T humanas o de cinomolgo.

La **Figura 8** muestra que las variantes IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA, IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA, e IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA indujeron bajos niveles de expresión de CD69 en células T humanas. Las **Figuras 8A** y **8B** muestran la inducción de la expresión de CD69 en células T del mono cinomolgo. La activación menor observada por las variantes no activadoras se puede deber al entrecruzamiento de las moléculas de CD3 a través de la unión bivalente de los anticuerpos contra CD3. Tal explicación está respaldada por la observación de que la activación se reduce a la concentración más alta donde la unión del anticuerpo es monovalente. El anticuerpo de control IgG1-b12 tampoco indujo la expresión de CD69 en células T humanas o de cinomolgo.

Las **Figuras 8C** y **8D** muestran que las variantes de anticuerpos biespecíficos no activadoras bsIgG1-huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, y bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA no inducen la expresión de CD69 en células T de seres humanos (**Figura 8C**) o monos cinomolgos (**Figura 8D**). Sin embargo, a las concentraciones de anticuerpos más altas se observó cierta inducción de la expresión de CD69.

Ejemplo 4 - Proliferación de células T inducida por variantes de anticuerpos contra CD3 humanizados.

El efecto de las variantes de anticuerpo humanizado CD3 (huCD3) (descrito en el Ejemplo 1) sobre la proliferación de células T humanas y de cinomolgo se evaluó mediante el kit ELISA de proliferación celular de Roche Applied Science (Cell Proliferation ELISA, kit BrdU, Núm. 11647229001; Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), que se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las PBMC humanas o de cinomolgo, aisladas de sangre completa o de una capa leucocitaria, se incubaron en placas de cultivo de 96 pocillos con series de diluciones (que oscilaban de 0,1 a 1.000 ng/mL en diluciones 1:10) de variantes de anticuerpo IgG1 huCD3. IgE-CD3 e IgG1-huCLB-T3/4 se incluyeron como controles positivos e IgG1-b12 como control negativo. Después de 3 días de incubación con los anticuerpos, se añadió BrdU (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) al medio y las placas se incubaron durante 5 horas. Las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante se recogió y almacenó a -20°C. Las placas se secaron y se almacenaron a 4°C hasta que se realizó el ELISA.

La incorporación de BrdU en el ADN se determinó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science). Las células se fijaron a las placas, donde después las placas se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. Las placas se lavaron con PBST y la unión se detectó utilizando tampón ABTS (en lugar de la solución de TMB proporcionada con el kit). El desarrollo del color se detuvo después de 30 minutos mediante la adición de ácido oxálico al 2% a los pocillos. A continuación, se midió la DO405 nm en un lector de ELISA EL808.

La **Figura 4** muestra que la incubación de PBMC con IgG1-CD3 parental y variantes de IgG1-huCD3 humanizadas con la región Fc de IgG1 de tipo salvaje indujo una fuerte proliferación de células T humanas (**Figura 4A**) y de cinomolgo (**Figura 4B**), incluso a concentraciones muy bajas de anticuerpos. La incubación con variantes LFLEDA no activadoras de los anticuerpos IgG1-huCD3 no indujo la proliferación de células T humanas (**Figuras 4A** y **9A**) o células T de cinomolgo (**Figuras 4B** y **9B**). Por lo tanto, aunque las variantes no activadoras de los anticuerpos IgG1-huCD3 indujeron bajos niveles de expresión de CD69 en las células T humanas (como se muestra en el Ejemplo 3), estas células IgG1-huCD3 no activadoras no indujeron la proliferación de las células T humanas. variantes.

Las **Figuras 9C** y **9D** muestran que las variantes de anticuerpos biespecíficos no activadoras son bsIgG1-huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA y bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA no

inducen la proliferación de células T aisladas de seres humanos (**Figura 9C**) o monos cinomolgos (**Figura 9D**).

Ejemplo 5 - *In vitro* Citotoxicidad mediada por células T inducida por variantes de anticuerpos contra CD3 humanizados

La citotoxicidad de células T específicas de tumor puede estar mediada por anticuerpos biespecíficos que se unen con un brazo a CD3 y con el otro brazo a una diana específica de tumor, tal como HER2. La unión simultánea de anticuerpos biespecíficos a las células T y a las células tumorales conducirá a la activación de las células T y a la citotoxicidad específica de las células tumorales. En este ejemplo, se evaluó la citotoxicidad mediada por células T contra células tumorales positivas para HER2 utilizando anticuerpos biespecíficos contra CD3 (variantes humanizadas) y HER2.

Por lo tanto, se cultivaron células AU565 (carcinoma de mama humano) en RPMI 1640 con un suplemento de CCS inactivado por calor al 10% (vol/vol), bicarbonato de sodio 1,5 g/l (Lonza), piruvato de sodio 1 mM, 4,5 g/L de glucosa (Sigma), 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina. La línea celular se mantuvo a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% (vol/vol). Las células AU565 se cultivaron hasta casi la confluencia, después de lo cual las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular para obtener una suspensión celular única. Se sembraron $5x10^4$ células en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos, y las células se incubaron durante al menos 3 horas a 37°C, CO_2 al 5% para permitir la adherencia a la placa.

Las PBMC humanas o de cinomolgo se aislaron a partir de sangre completa o de la capa leucocitaria. Las PBMC aisladas se lavaron con PBS, se resuspendieron en medio de cultivo y se añadieron en una proporción 1:1 a las células tumorales AU565 en las placas de 96 pocillos. El porcentaje de células T presentes en las PBMC se midió mediante análisis FACS, utilizando un anticuerpo anti-CD3-PerCP humano (BD, Núm. 345766) de ratón (para la tinción de células T), que presenta reacción cruzada con CD3 de cinomolgo. El contenido de células T en la población de PBMC utilizadas fue típicamente de 50 al 60%.

Se prepararon series de diluciones (concentraciones finales que oscilaban de 0,001 a 10.000 ng/mL) de variantes de anticuerpos biespecíficos bsIgG1 CD3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA, bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA y bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA en medio de cultivo y se añadieron a las placas. IgG1-HER2-LFLEDA e IgG1-b12 se incluyeron como controles. Además de las mutaciones no activadoras, las variantes del anticuerpo LFLEDA contienen mutaciones F405L o K409R para la preparación en formato biespecífico (véase el Ejemplo 1). Las placas se incubaron durante 3 días a 37°C, CO_2 al 5%. La incubación de las células con estaurosporina 1 µM (Núm. S6942-200, Sigma) se utilizó como referencia para 100% de destrucción de células tumorales. Las placas se lavaron dos veces con PBS, y se añadieron 150 µl de medio de cultivo que contenía azul Alamar al 10% a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C, CO_2 al 5%. Se midió la absorbancia a 590 nm (Envision, Perkin Elmer, Waltham, MA).

La variantes de anticuerpos biespecíficos CD3xHER2-LFLEDA (bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA y bsIgG1-CD3xHER2-LFLEDA) indujeron la destrucción de células AU565 a bajas concentraciones utilizando células efectoras humanas (**Figura 5A**) o células efectoras de cinomolgo (**Figura 5B**) El anticuerpo de control biespecífico contra CD3 huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA, que no muestra reactividad cruzada con CD3 de cinomolgo, solo indujo la destrucción de células AU565 cuando se utilizaron PBMC humanas (**Figura 5A**). Por lo tanto, no se observó destrucción de las células diana cuando se utilizaron células efectoras de cinomolgo en el ensayo (**Figura 5B**). La incubación con anticuerpos monoespecíficos IGG1-b12 o IgG1-HER2-LFLEDA o bsIgG1-CD3xb12-LFLEDA no indujo la destrucción inespecífica de las células diana.

Las variantes de anticuerpos biespecíficos bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, y bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA indujeron la destrucción de células AU565 a bajas concentraciones utilizando células efectoras humanas (**Figura 10A**) o células efectoras de cinomolgo (**Figura 10B**). La incubación con anticuerpos monoespecíficos IgG1-b12 o IgG1-HER2-LFLEDA no indujo la destrucción inespecífica de células diana (**Figura 10A** y **B**). Por lo tanto, las variantes de CD3 humanizadas que comprenden la región Fc no activadora no inducen la destrucción de células diana inespecíficas, lo que indica que se pueden utilizar las variantes que comprenden una región Fc no activadora para asegurar la activación de células T elegidas como diana y así evitar la activación de las células T no elegidas como diana.

Ejemplo 6 - Activación de células T Rhesus por variantes de anticuerpos contra CD3 humanizados

La expresión de CD69 en células T de rhesus se evaluó para determinar la activación temprana de las células T después de la incubación con variantes de anticuerpos humanizados CD3 (huCD3) con la región Fc de IgG1 de tipo salvaje. El aislamiento de las PBMC de rhesus y la evaluación de la expresión de CD69 por citometría de flujo se

realizó como se describe en el Ejemplo 3.

La **Figura 11** muestra que las variantes de anticuerpos contra CD3 humanizados IgG1-huCD3-H1L1, IgG1-huCD3-H1L2, IgG1-huCD3-H1L3, IgG1-huCD3-H3L3 e IgG1-huCD3-H4L1 indujeron la expresión de CD69 en células T con origen de rhesus a niveles similares a IgG1-CD3 (como se describe en el Ejemplo 1). El anticuerpo de control negativo IgG1-b12 no indujo la expresión de CD69 en las células T de rhesus. Por lo tanto, las variantes de huCD3 de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en experimentos que implican CD3 de mono rhesus. Las variantes de huCD3 presentan reacción cruzada con CD3 de mono rhesus.

Ejemplo 7 - Activación de células T por variantes no activadoras de huCLB-T3/4

La expresión de CD69 en células T se evaluó mediante análisis FACS para determinar la activación temprana de las células T después de la incubación con variantes IgG1-huCLB-T3/4 con mutaciones en la región Fc (véase el Ejemplo 1).

Las PBMC se aislaron de sangre completa o de la capa leucocitaria mediante separación por gradiente de densidad utilizando tubos Leucosep (Núm. 227290; Greiner Bio-one, Alphen a/d Rijn, Países Bajos), se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo.

Se prepararon una serie de respuesta a la dosis de variantes IgG1-huCLB-T3/4, un control negativo (IgG1-huCLB-T3/4-Fab) y un control positivo (IgE-huCLB-T3/4) en medio de cultivo (de 1 a 1000 ng/mL en diluciones 1:3) y se añadieron a los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos que contenía las PBMC. Después de 16-24 horas de incubación, las células se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante (que contenía citocinas) se recogió y almacenó a -20°C. A continuación, se lavaron las células con PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02% y se tiñeron durante 30 minutos a 4°C con un anti-CD28-PE humano de ratón (854.222.010; Sanquin, Amsterdam, Países Bajos; marcador de células T) y anticuerpo anti-CDC-APC humano de ratón (340560; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando dos veces con PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02%. Las células se resuspendieron en 150 µl/pocillo y se midió la expresión de CD69 en células positivas para CD28 en FACS Canto II (BD Biosciences).

La **Figura 12A** muestra que la expresión de CD69 era alta en las células que se incubaron con IgE-huCLB-T3/4, IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-huCLB-T3/4-DA e IgG1-huCLB-T3/4-DAPS. La incubación con IgG1-huCLB-T3/4-N297Q indujo niveles de expresión de CD69 algo más bajos en comparación con IgG1-huCLB-T3/4 de tipo salvaje, y la incubación con IgG1-huCLB-T3/4-LFLE e IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS indujo CD69 en menor medida. La incubación de PBMC con anticuerpos Fab IgG1-CD3, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA, IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ, IgG1-huCLB-T3/4-DANQ e IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS no induce ninguna expresión de CD69 en células T.

La **Figura 12B.** muestra que la expresión de CD69 era alta en las células que se incubaron con IgE-huCLB-T3/4 e IgG1-huCLB-T3/4. La incubación con IgG1-huCLB-T3/4-LALA indujo niveles de expresión de CD69 algo más bajos en comparación con IgG1-huCLB-T3/4 de tipo salvaje, y la incubación con IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA e IgG1-b12 (control negativo) no indujo ninguna expresión de CD69 en las células T.

Ejemplo 8 - Proliferación de células T por variantes no activadoras de huCLB-T3/4

El efecto de las variantes de huCLB-T3/4 (descrito en el Ejemplo 1) sobre la proliferación de células T se evaluó mediante el kit ELISA de proliferación celular de Roche Applied Science (Cell Proliferation ELISA, kit BrdU, Núm. 11647229001; Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), que se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las PBMC, aisladas de sangre completa o capa leucocitaria, se incubaron en placas de cultivo de 96 pocillos con series de diluciones (que oscilaban de 0,1 a 1000 ng/mL) de variantes de IgG1-CD3. IgE-CD3 e IgG1-CD3 se incluyeron como controles positivos e IgG1-b12 (con la mutación K409R para la generación de anticuerpos biespecíficos) como control negativo. Después de 3 días de incubación con los anticuerpos, se añadió BrdU (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) al medio y las placas se incubaron durante 5 horas. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y el sobrenadante se recogió y almacenó a -20°C. Las placas se secaron y se almacenaron a 4°C hasta que se realizó el ELISA.

La incorporación de BrdU al ADN se determinó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cell Proliferation ELISA, kit BrdU, Núm. 11647229001; Roche Applied Science). Las células se fijaron a las placas, después de lo cual las placas se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente (RT) con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. Las placas se lavaron con PBST y la unión se detectó utilizando tampón ABTS (en lugar de la solución de TMB proporcionada con el kit). El desarrollo del color se detuvo después de 30 minutos mediante la adición de ácido oxálico al 2% a los pocillos. A continuación, se midió la DO405 nm en un lector de ELISA EL808.

La **Figura 13A** muestra que la incubación de PBMC con IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-huCLB-T3/4-DA e IgG1-huCLB-T3/4-DAPS indujo una fuerte proliferación de células T, incluso a concentraciones muy bajas de anticuerpos. La incubación con IgG1-huCLB-T3/4-N297Q indujo una proliferación dependiente de la dosis, que fue comparable al control positivo IgE-huCLB-T3/4. La incubación de PBMC con los anticuerpos IgG1-huCLB-T3/4-Fab, IgG1-b12-N297Q, IgG1-huCLB-T3/4-LFLE, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA, IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS, IgG1-huCLB-T3/4-DANQ e IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS no indujo la proliferación de células T.

La **Figura 13B** muestra que la incubación de PBMC con IgG1-huCLB-T3/4 indujo una fuerte proliferación de células T, incluso a concentraciones muy bajas de anticuerpos. La incubación con IgE-huCLB-T3/4 (control positivo) e IgG1-huCLB-T3/4-LALA indujo la proliferación dependiente de la dosis. La incubación de PBMC con IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA no induce la proliferación de células T.

En base a los resultados de los Ejemplos 7 y 8, un subconjunto de mutantes que se consideraron menos activadores, se sometió a un análisis adicional.

Ejemplo 9 - Citotoxicidad mediada por células T *In vitro* inducida por variantes de anticuerpos no activadoras huCLB-T3/4

Se cultivaron células AU565 (carcinoma de mama humano) en RPMI 1640 con un suplemento de CCS inactivado por calor al 10% (vol/vol), 1,5 g/L de bicarbonato de sodio (Lonza), piruvato de sodio 1 mM, 4,5 g/L de glucosa (Sigma), 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina. La línea celular se mantuvo a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% (vol/vol). Las células AU565 se cultivaron hasta casi la confluencia. Las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular para obtener una suspensión celular única. Se sembraron $5x10^4$ células en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos, y las células se incubaron al menos durante 3 horas a 37°C, CO2 al 5% para permitir la adherencia a la placa.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre de voluntarios sanos utilizando tubos de 30 mL Leucosep, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Greiner Bio-one). Las PBMC aisladas se lavaron con PBS, se resuspendieron en medio de cultivo y se añadieron a una proporción 1:1 a las células tumorales AU565 en las placas de 96 pocillos. El porcentaje de células T presentes en las PBMC se midió mediante análisis FACS, utilizando un anticuerpo anti-CD3-PerCP humano de ratón (BD, Núm. 345766) (para teñir las células T). El contenido de células T en la población de PBMC utilizadas fue típicamente de 50 a 60%.

Se prepararon series de diluciones (concentraciones finales que oscilaban de 0,004 a 1000 ng/mL) de anticuerpos IgG1-b12, IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-HER2 y huCLB-T3/4xb12 y huCLB-T3/4xHER2 biespecíficos expresados como diferentes variantes de Fc, tipo salvaje, N297Q, LFLE, LALA, LFLENQ, LFLEDA, DANQ y LFLEDENQPS, en medio de cultivo y se añadieron a las placas. Las placas se incubaron durante 3 días a 37°C, CO_2 al 5%. La incubación de células con estaurosporina 1 µM (Núm. S6942-200, Sigma) se utilizó como referencia para 100% de destrucción de células tumorales. Después de la incubación, los sobrenadantes se eliminaron y se almacenaron a -20°C. Las placas se lavaron dos veces con PBS, y se añadieron 150 µl de medio de cultivo que contenía azul Alamar al 10% a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C, CO_2 al 5%. Se midió la absorbancia a 590 nm (Envision, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Se realizaron dos experimentos utilizando PBMC de diferentes donantes. En el primer experimento, se probaron las variantes de Fc N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ y LFLEDANQPS (**Figura 14A-G**) En el segundo experimento, se probaron las variantes de Fc LFLEDA y LALA (**Figura 15A-C**). Se incluyeron anticuerpos con dominios Fc de tipo salvaje en ambos experimentos como referencia. La incubación con anticuerpos IgG1-huCLB-T3/4 monoespecíficos o anti-huCLB-T3/4xb12 biespecíficos de tipo salvaje indujo la destrucción inespecífica de las células diana (**Figuras 14A-G** y **15C.A**). Las variantes IgG1-huCLB-T3/4 y bsIgG1-huCLB-T3/4xb12 monoespecíficas N297Q **(Figura 14A-G)** y LALA (**Figura 15A-C**) todavía indujeron algunas muertes inespecíficas de células diana, aunque en menor medida que el anticuerpo de tipo salvaje probado en el mismo experimento. La destrucción de células diana inespecíficas no fue inducida por ninguno de los otros anticuerpos IgG1-huCLB-T3/4 o bsIgG1-huCLB-T3/4xb12 probados con mutaciones no activadoras (**Figuras 14A-G** y **15C.A**).

Todos los anticuerpos huCLB-T3/4xHER2 biespecíficos indujeron la destrucción dependiente de la dosis de células AU565 con una eficacia al menos comparable en comparación con el anticuerpo huCLB-T3/4xHER2 biespecífico sin mutaciones no activadoras (**Figuras 14A-G** y **15C.A**). La destrucción máxima ocurrió a concentraciones muy bajas.

No se indujo citotoxicidad por variantes de tipo salvaje o no activadoras de los anticuerpos b12 o HER2 monoespecíficos (**Figuras 14A-G** y **15C.A**), que era lo esperado.

Ejemplo 10 - Evaluación de la unión de C1q a variantes de anticuerpos no activadoras de huCLB-T3/4

La interacción de C1q con anticuerpos unidos a una célula diana es el primer paso en la vía clásica de activación del

complemento. Puesto que la IgG1 de tipo salvaje alberga el sitio de interacción para C1q, se evaluó la interacción de C1q con estas variantes de IgG1 no activadoras mediante un ELISA.

Las series de diluciones (intervalo 7-30.000 ng/mL en diluciones 1:4) de IgG1-huCLB-T3/4, bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2 e IgG1-CD20 (control positivo) y variantes de anticuerpos no activadoras como se describió anteriormente en el ejemplo 1 de los mismos se aplicaron como recubrimiento sobre placas ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron y bloquearon con PBS con un suplemento de Tween 20 al 0,025% y gelatina al 0,1%. Con lavados entre las incubaciones, las placas se incubaron secuencialmente con suero humano agrupado al 3% (Sanquin, Núm. de producto M0008) durante 1 hora a 37°C, con 100 µL/pocillo de anti-C1q humano de conejo (DAKO, Núm. de producto A0136, 1/4.000) durante 1 hora a temperatura ambiente, y con 100 µl/pocillo de anti-IgG-HRP de conejo porcino (DAKO, P0399, 1:10.000) como anticuerpo de detección durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante la adición de 1 mg/mL de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania) durante aproximadamente 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido oxálico al 2%. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT). Los datos por transformación log se analizaron ajustando curvas de dosis-respuesta sigmoideas con pendiente variable utilizando el soporte lógico GraphPad Prism.

La **Figura 16A** muestra que los anticuerpos con regiones Fc de IgG1 de tipo salvaje, IgG1-CD20 e IgG1-huCLB-T3/4 mostraron unión a C1q. No se detectó la unión de C1q en todas las variantes de anticuerpos evaluadas con mutaciones no activadoras (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DA, DAPS, DANQ, LFLEPS, LFLEDANQPS, LALA).

La **Figura 16B** muestra que el anticuerpo con la región Fc de IgG1 de tipo salvaje bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2 mostró unión a C1q. No se detectó la unión de C1q en todas las variantes de anticuerpos evaluadas con mutaciones no activadoras (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DA, DAPS, DANQ, LFLEPS, LFLEDANQPS, LALA).

La **Figura 16C** y **Figura 16D** muestran que los anticuerpos con regiones Fc de IgG1 de tipo salvaje, IgG1-CD20, IgG1-huCLB-T3/4 y bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2 mostraron unión a C1q. No se detectó la unión de C1q en las variantes de anticuerpos con mutaciones no activadoras (LFLEDA y LALA).

Ejemplo 11 - Análisis farmacocinético (PK) de variantes de anticuerpos no activadoras

Los ratones en este estudio se alojaron en una unidad de barrera de la Instalación Central de Animales de Laboratorio (Utrecht, Países Bajos) y se mantuvieron en jaulas con filtro en la parte superior y agua y alimentos proporcionados a voluntad. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética animal de la Universidad de Utrecht. A ratones SCID CB-17 de 7-10 semanas (CB-17/Icr-Prkdc <Scid>/IcrIcoCrl, Charles-River) se les inyectaron por vía intravenosa 100 µg de anticuerpo de tipo salvaje (IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-HER2, o bsIgG-huCLB-T3/4xHER2) o variantes no activadoras de los mismos (LALA, LFLEDA, LFLENQ, DANQ o LFLEDANQPS) utilizando 3 ratones por grupo. Se recogieron 50 µL de muestras de sangre de la vena safena a los 10 minutos, 4 horas, 1 día, 2 días, 7 días, 14 días y 21 días después de la administración de los anticuerpos. Se recogió sangre en viales que contenían heparina y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 x g. El plasma se almacenó a -20°C hasta la determinación de las concentraciones de anticuerpos.

Las concentraciones de IgG humana se determinaron utilizando un ELISA sándwich de hIgG total. Para este ensayo, se utilizó el clon MH16 de mAb de ratón anti-IgG-kappa humano (Núm. M1268, CLB Sanquin, Países Bajos), aplicado como recubrimiento sobre placas de ELISA Microlon de 96 pocillos (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/mL como anticuerpo de captura. Después de bloquear las placas con PBS con un suplemento de albúmina de suero bovino al 0,2%, se añadieron muestras, se diluyeron seriadamente con tampón ELISA (PBS con un suplemento de Tween 20 al 0,05% y albúmina de suero bovino al 0,2%), y se incubaron en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Las placas se incubaron posteriormente con anti- inmunoglobulina IgG humana de cabra (Núm. 109-035-098, Jackson, West Grace, PA) y se desarrollaron con ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemania). La reacción se detuvo después de 30 minutos mediante la adición de ácido oxálico al 2% a los pocillos. La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm.

Las tasas de aclaramiento plasmático (mL/día/kg) se calcularon en función del área bajo la curva (AUC), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Aclaramiento plasmático} = \frac{\text{Dosis (µg/kg)}}{\textit{AUC (µg/mL/día)}}$$

El análisis de datos se realizó con el soporte lógico Graphpad prism.

Figura 17A muestra que las concentraciones plasmáticas de IgG humana fueron más bajas para las variantes de anticuerpos N297Q, DANQ, LFLENQ y LFLEDANQPS en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje, lo que sugiere un aclaramiento más rápido. Las concentraciones de IgG humana en plasma para las variantes de anticuerpos LFLEDA y LALA fueron similares a las de los anticuerpos de tipo salvaje.

Figura 17B muestra que las tasas de aclaramiento plasmático de las variantes de anticuerpos N297Q, DANQ y LFLENQ fueron de 2 a 3 veces más altas que las del anticuerpo de tipo salvaje. La tasa de aclaramiento de la variante de anticuerpo LFLEDANQPS fue 3-5 veces mayor que la del anticuerpo de tipo salvaje. Las tasas de aclaramiento plasmático de las variantes de anticuerpos LFLEDA y LALA fueron similares a las de los anticuerpos de tipo salvaje.

Ejemplo 12 - Evaluación *In vitro* de la inmunogenicidad del esqueleto de IgG1-LFLEDA

Para determinar el potencial de inmunogenicidad clínica del esqueleto de IgG1-LFLEDA-K409R, se aplicó la plataforma EpiScreen™ de Antitope a IgG1-HER2-LFLEDA. En resumen, las PBMC se aislaron de una cohorte de 50 donantes sanos tipificados con HLA que representan a la población europea y norteamericana. Después del agotamiento de las células T CD8+, las preparaciones de PBMC se congelaron y almacenaron individualmente. Las PBMC descongeladas se cultivaron posteriormente y se incubaron con IgG1-HER2-LFLEDA-K409R o una de las muestras de control (IgG1-HER2 o IgG1-HER2-LFLE-K409R) durante 5 a 8 días. La capacidad de las muestras para inducir respuestas de células T CD4+ se evaluó midiendo la proliferación celular (incorporación de [3^H]-timidina) y la producción de IL-2 (ensayo ELISpot). Los donantes que mostraron respuestas con un índice de estimulación (IE; señal/señal de referencia) ≥1,9 en ambos ensayos se consideraron positivos.

El análisis EpiScreen™ mostró que para IgG1-HER2-LFLEDA, 4 donantes (8%) mostraron respuestas positivas de células T CD4+, que fueron comparables a 4 (8%) y 3 (6%) respuestas positivas para IgG1-HER2 e IgG1-HER2-LFLE, respectivamente **(Figura 18).** Por lo tanto, IgG1-HER2-LFLEDA-K409R (así como IgG1-HER2 e IgG1-HER2-LFLE-K409R) mostraron un bajo potencial de inmunogenicidad con frecuencias de respuestas inferiores a 10%. Se utilizó A33 humanizado de control positivo (p. ej., [84]) como anticuerpo de control clínico de referencia que muestra altos niveles de inmunogenicidad en ensayos clínicos e induce habitualmente respuestas de células T dl 20-30% en el ensayo EpiScreen.

Lista de referencias

Lista de Referencias

[1] Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26
[2] Herold et al., 2005, Diabetes, 54(6):1763-9
[3] Staerz, et.al., 1985, Nature 314:628-631
[4] Muller and Kontermann, 2010, BioDrugs 24: 89-98
[5] Lum and Thakur, 2011, BioDrugs 25: 365-379
[6] Linke et al., 2010, MAbs 2: 129-136
[7] Ruf et al., 2010, Br J Clin Pharmacol 69: 617-625
[8] Bokemeyer et al., 2009, J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 3036
[9] Heiss et al., 2010, Int J Cancer 127: 2209-2221
[10] Jones et al., 2009, Lancet Oncol 10:1179-1187
[11] Kiewe et al., 2006, Clin Cancer Res 12:3085-3091
[12] Documento WO 2012/162067
[13] Documento WO 2008/119567
[14] Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)
[15] Lefranc MP, et al., 2003, Dev Comp Immunol. Enero;27(1):55-77
[16] Brochet, X. et al., 2008, Nucl.Acids Res. 36, W503-508
[17] Giudicelli, V., Brochet, X, Lefranc, M.-P., 2011, Cold Spring Harb Protoc. 1 Jun;2011(6)
[18] Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cap. 15
[19] Documento WO92/22653
[20] Documento EP 0 629 240
[21] E. Meyers y W. Miller, 1988, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17
[22] Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 444-453
[23] Clustal W algorithm, Thompson, 1994
[24] T cell Epitope Database de p. ej. http://www.iedb.org/
[25] Perry et al., 2008 Drugs R D 9 (6):385-396
[26] Bryson et al., 2010, Biodrugs 24 (1):1-8
[27] Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5ª Edición - US Department of Health and Human Services, Publicación NIH Núm. 91-3242, pág. 662,680,689

[28] Oganesyan et al., 2008, Acta Cryst. (D64):700-4
[29] Canfield et al., 1991, J. Exp.Med. (173): 1483-91
[30] Duncan et al., 1988, Nature (332):738-40
[31] Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604
[32] Idusogie EE, et al., 2000, J Immunol. 164: 4178-84
[33] Leabman et al., 2013, MAbs; 5(6):896-903
[34] Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546
[35] Bruhns et al. 2009, Blood 113: 3716-3725
[36] Documento WO 2011/066501
[37] Lightle, S., et al., 2010, Protein Science (19):753-62
[38] Brekke et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138
[39] Dall'Acqua WF, et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138
[40] Wu et al., 2010, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, En: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg
[41] Documento WO 2011/131746
[42] Documento WO 2002/020039
[43] Documento WO 98/050431
[44] Documento WO 2011/117329
[45] Documento EP 1 870 459
[46] Documento WO 2009/089004
[47] Documento US 2010 00155133
[48] Documento WO 2010/129304
[49] Documento WO 2007/110205
[50] Documento WO 2010/015792
[51] Documento WO 2011/143545
[52] Documento WO 2012/058768
[53] Documento WO 2011/028952
[54] Documento WO 2008/003116
[55] Documento US 7.262.028
[56] Documento US 7.612.181
[57] Documento WO 2010/0226923
[58] Documento US 7.951.918
[59] Documento CN 102250246
[60] Documento WO 2012/025525
[61] Documento WO 2012/025530
[62] Documento WO 2008/157379
[63] Documento WO 2010/080538
[64] Sykes y Johnston, 1997, Nat Biotech 17, 355-59
[65] Documento US 6.077.835
[66] Documento WO 2000/70087
[67] Schakowski et al., 2001, Mol Ther 3, 793-800
[68] Documento WO 2000/46147
[69] Benvenisty y Reshef, 1986, PNAS USA 83, 9551-55
[70] Wigler et al., 1978, Cell 14, 725
[71] Coraro y Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7, 603
[72] Documento US 5.589.466
[73] Documento US 5.973.972
[74] Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol Chem 264, 5503-5509
[75] F. Ausubel et al., 1987, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience Nueva York
[76] Grant et al., 1987, Methods in Enzymol 153, 516-544
[77] Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
[78] Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978
[79] Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy, Plenum Press 1988
[80] Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Gennaro et al., (eds.), pág. 624-652, Mack Publishing Co., 1990
[81] Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", en Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.), Chapman & Hall 1993
[82] Documento US 5.057.313
[83] Documento US 6.331.175
[84] Ritter G, et al.; 2001, Cancer Res., 61:6851-9
[85] Documento WO 2007/042261

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genmab B.V.

<120> Anticuerpos contra CD3 humanizados o quiméricos

<130> P/0082-WO

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2
Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 3
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4
Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 6
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 6

Glu Val Lys Leu Val 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 Asn Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met 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> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 7
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met 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> 8

<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 8

```
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

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

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met 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> 9
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met 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 Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10
<211> 109
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 10
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe 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> 11
<211> 109
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe 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> 12
<211> 109
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 12
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp 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> 13
<211> 186
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13

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 Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile
100 105 110

Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr
115 120 125

Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly
130 135 140

Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro
145 150 155 160

Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
180 185

<210> 14
<211> 150
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 14

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

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 Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro
65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val Ile Ala Thr Leu Leu
85 90 95

Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His Glu Thr Gly Arg Leu
100 105 110

Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr
115 120 125

Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly
130 135 140

Asn Trp Ala Arg Asn Lys
145 150

<210> 15
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 15
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 16
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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

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

Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Ser Arg Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Val
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg
100 105

<210> 19
<211> 121
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 19

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 Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr 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 Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 20
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

<210> 21
<211> 177
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 21

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln
1 5 10 15

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

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly
50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
85 90 95

Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu
100 105 110

Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys
115 120 125

Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly
130 135 140

Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
145 150 155 160

Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg
165 170 175

Ile

<210> 22
<211> 177
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 22

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr His
1 5 10 15

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

Gly Ser Glu Val Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly
50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
85 90 95

Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu
100 105 110

Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys
115 120 125

Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly
130 135 140

Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
145 150 155 160

Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg
165 170 175

Ile

<210> 23
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 23
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 24
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 25
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26
<211> 330

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 27
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met 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 Ala
115 120 125

<210> 28
<211> 109
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 28
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

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

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

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe 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> 29
<211> 122
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 30
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une a CD3 humano, en donde dicho anticuerpo comprende una región de unión que comprende una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 10.

2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo.

3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en donde la región Fc comprende cadenas pesadas de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

4. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo comprende una región Fc que comprende una primera y una segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina, en donde en dicha primera y segunda cadenas pesadas los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, son F, E y A, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones correspondientes a N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, son N y P, respectivamente, en donde las posiciones de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de EU.

5. El anticuerpo según la reivindicación 4, que comprende regiones constantes de cadena pesada de SEQ ID NO: 16.

6. El anticuerpo según la reivindicación 4, que comprende regiones constantes de cadena pesada de SEQ ID NO: 25.

7. El anticuerpo según la reivindicación 4, que comprende regiones constantes de cadena pesada de SEQ ID NO: 26.

8. El anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y una segunda región de unión que se une a una diana diferente que dicha primera región de unión.

9. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 8, en donde dicho anticuerpo comprende una primera y una segunda cadenas pesadas.

10. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 9, en donde dicho anticuerpo biespecífico comprende una región Fc modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

11. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde cada una de dicha primera y segunda cadenas pesadas comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y CH3, en donde en dicha primera cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana, y en dicha segunda cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en una cadena pesada de IgG1 humana han sido sustituidos, y en donde dichas primera y segunda cadenas pesadas no están sustituidas en las mismas posiciones.

12. El anticuerpo biespecífico según la reivindicación 11, en donde el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en dicha segunda cadena pesada, o viceversa.

13. El anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde dicha primera región de unión es según la reivindicación 1, y dicha segunda región de unión se une a una diana diferente que dicha primera región de unión.

14. Una construcción de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 10.

15. Un vector de expresión que comprende

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y
(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Una célula anfitriona que comprende un vector de expresión de la reivindicación 15, o un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

17. La célula anfitriona según la reivindicación 16, en donde dicha célula anfitriona es una célula anfitriona eucariótica recombinante, procariótica recombinante o microbiana recombinante.

18. Una composición que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.

19. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, dicho anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, dicha composición según la reivindicación 18 o dicha composición farmacéutica según la reivindicación 19 para su uso como medicamento.

21. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, dicho anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, dicha composición según la reivindicación 18 o dicha composición farmacéutica según la reivindicación 19, para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

22. El anticuerpo, anticuerpo biespecífico, composición o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 21, en donde la enfermedad es el cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmunitaria.

23. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que comprende las etapas de

a) cultivar una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 16 o 17; y
b) purificar dicho anticuerpo de los medios de cultivo.

24. Un método para detectar la presencia de antígeno CD3, o una célula que expresa CD3, en una muestra que comprende las etapas de;

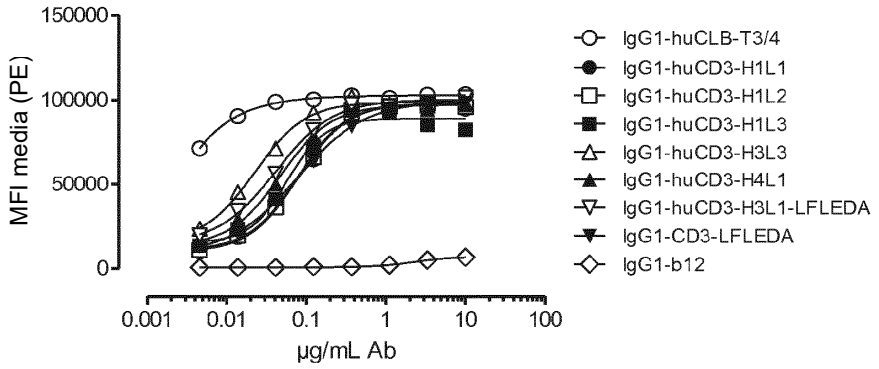
a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre dicho anticuerpo o anticuerpo biespecífico y CD3; y
b) analizar si se ha formado un complejo.

25. Un kit para detectar la presencia de antígeno CD3, o una célula que expresa CD3, en una muestra que comprende

i) un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un anticuerpo biespecífico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13; y
ii) instrucciones de uso de dicho kit.

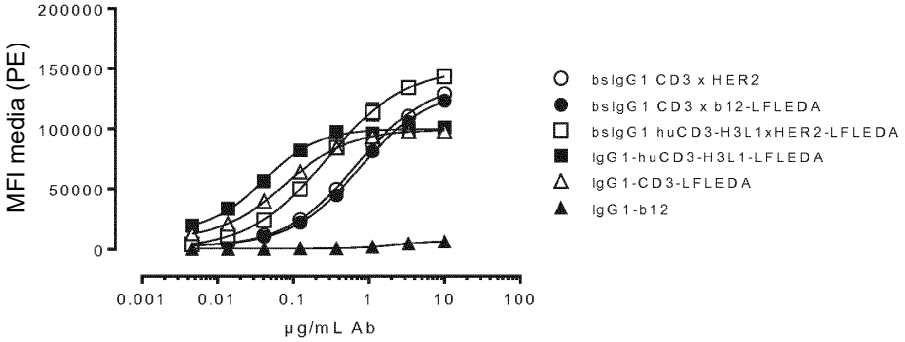
Figura 1

A



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
IgG1-huCD3-H1L1	0.07
IgG1-huCD3-H1L2	0.08
IgG1-huCD3-H1L3	0.06
IgG1-huCD3-H3L3	0.02
IgG1-huCD3-H4L1	0.05
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.08

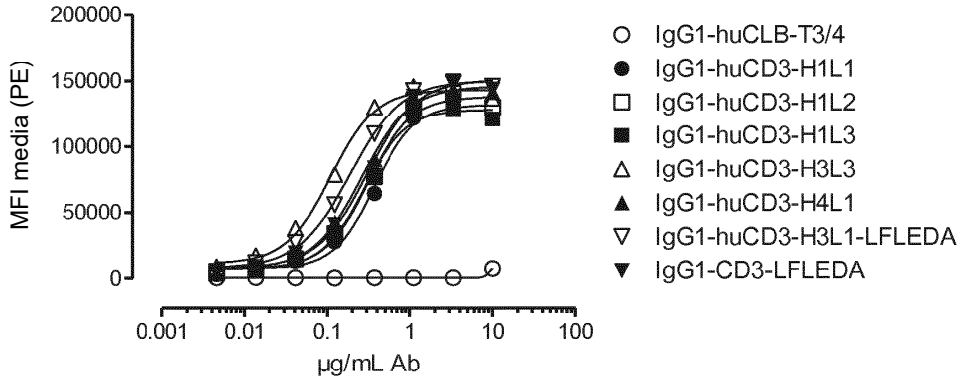
B



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
bsIgG1 CD3 x HER2	0.68
bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA	0.75
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.07

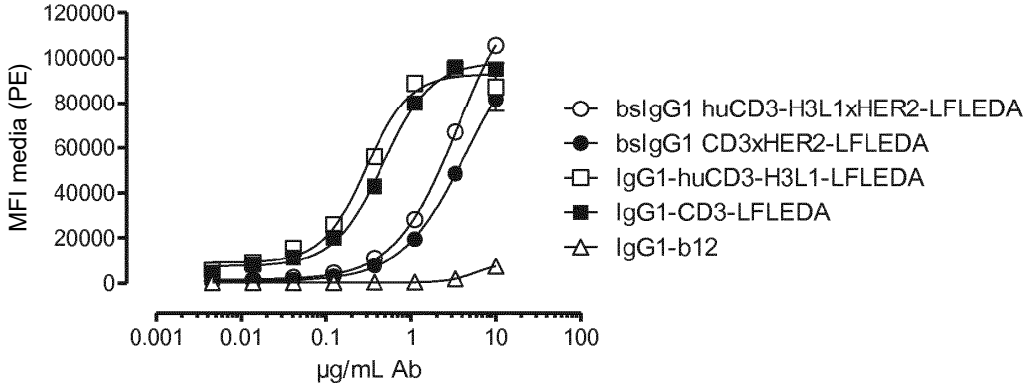
Figura 2

A



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
IgG1-huCD3-H1L1	0.37
IgG1-huCD3-H1L2	0.31
IgG1-huCD3-H1L3	0.28
IgG1-huCD3-H3L3	0.11
IgG1-huCD3-H4L1	0.26
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.19
IgG1-CD3-LFLEDA	0.30

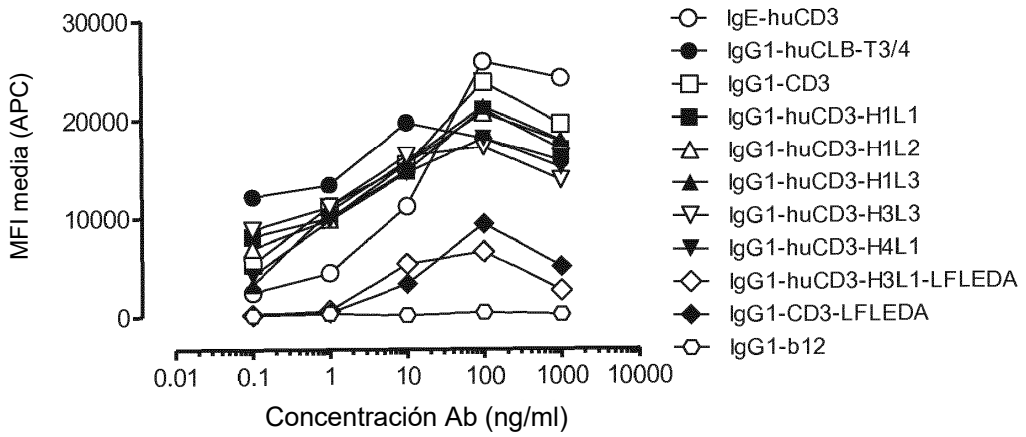
B



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
bsIgG1 CD3xHER2-LFLEDA	4.46
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	3.54
IgG1-CD3-LFLEDA	0.47
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.30

Figura 3

A


30000
20000
10000
0
MFI media (APC)
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCD3
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-CD3
IgG1-huCD3-H1L1
IgG1-huCD3-H1L2
IgG1-huCD3-H1L3
IgG1-huCD3-H3L3
IgG1-huCD3-H4L1
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-CD3-LFLEDA
IgG1-b12

B

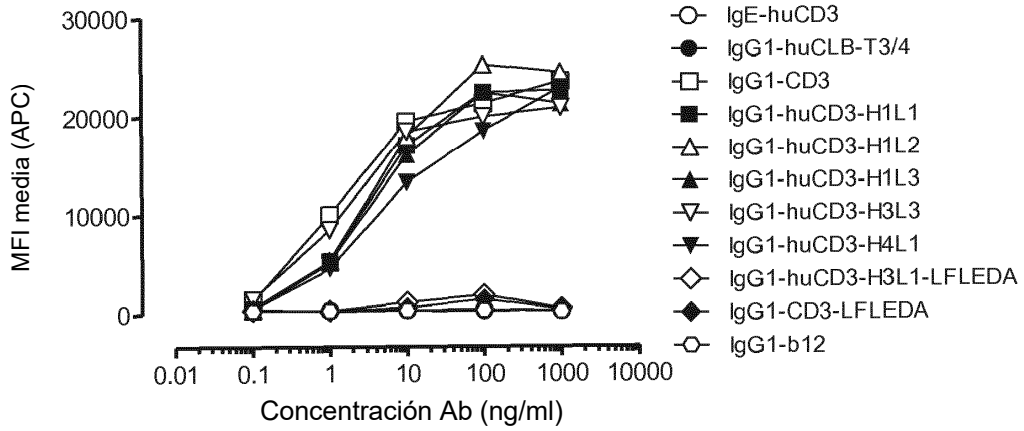
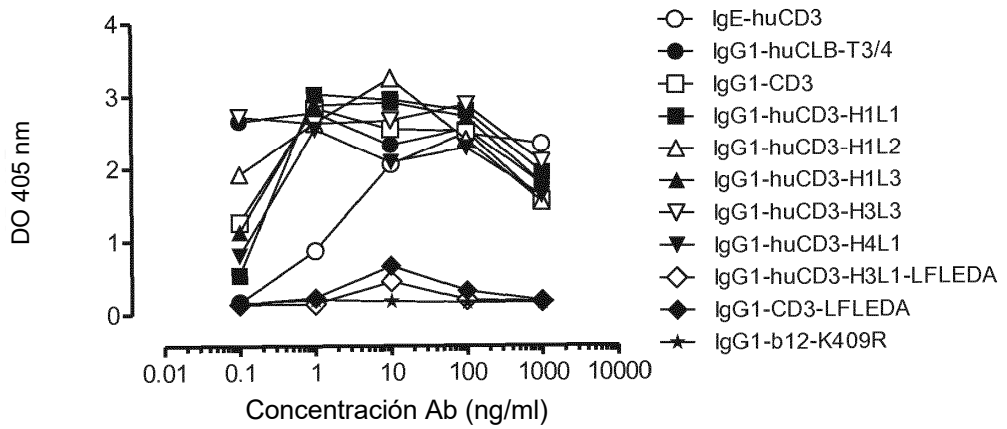

30000
20000
10000
0
MFI media (APC)
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCD3
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-CD3
IgG1-huCD3-H1L1
IgG1-huCD3-H1L2
IgG1-huCD3-H1L3
IgG1-huCD3-H3L3
IgG1-huCD3-H4L1
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-CD3-LFLEDA
IgG1-b12

Figura 4

A


DO 405 nm
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCD3
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-CD3
IgG1-huCD3-H1L1
IgG1-huCD3-H1L2
IgG1-huCD3-H1L3
IgG1-huCD3-H3L3
IgG1-huCD3-H4L1
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-CD3-LFLEDA
IgG1-b12-K409R

B

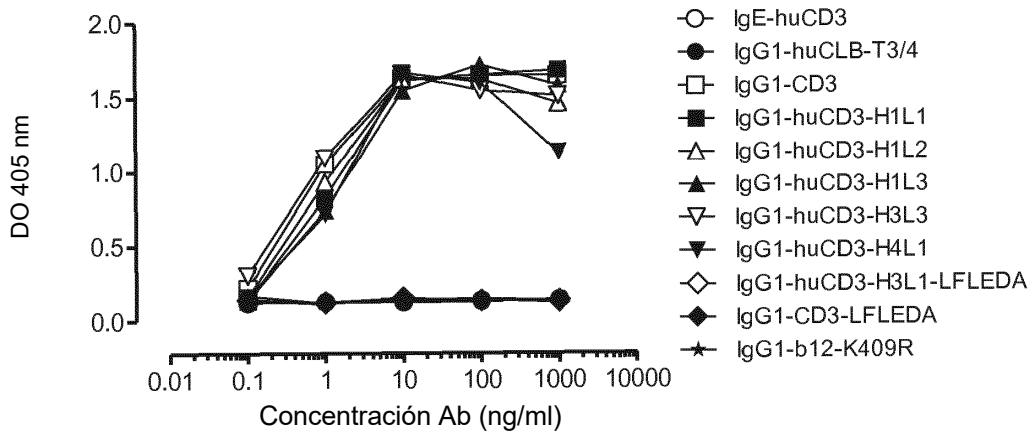
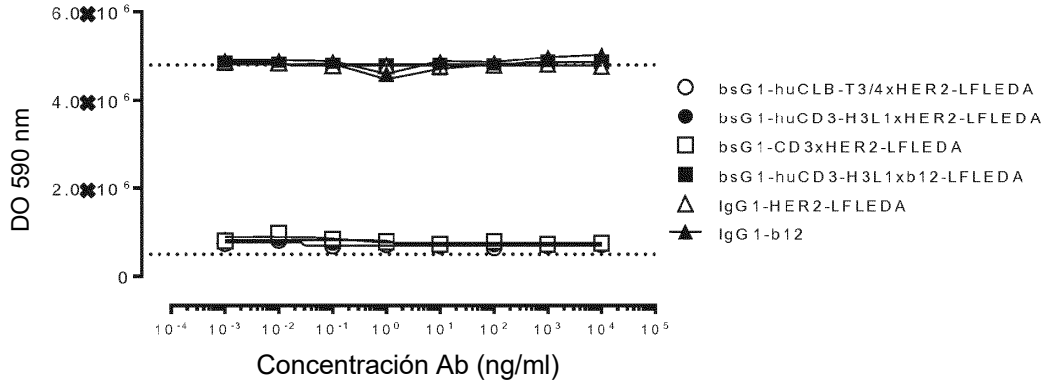

DO 405 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCD3
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-CD3
IgG1-huCD3-H1L1
IgG1-huCD3-H1L2
IgG1-huCD3-H1L3
IgG1-huCD3-H3L3
IgG1-huCD3-H4L1
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-CD3-LFLEDA
IgG1-b12-K409R

Figura 5

A


6.0×10 6
4.0×10 6
2.0×10 6
0
DO 590 nm
10 -4 10 -3 10 -2 10 -1 10 0 10 1 10 2 10 3 10 4 10 5
Concentración Ab (ng/ml)
bsG1-huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA
bsG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA
bsG1-CD3xHER2-LFLEDA
bsG1-huCD3-H3L1xb12-LFLEDA
IgG1-HER2-LFLEDA
IgG1-b12

B

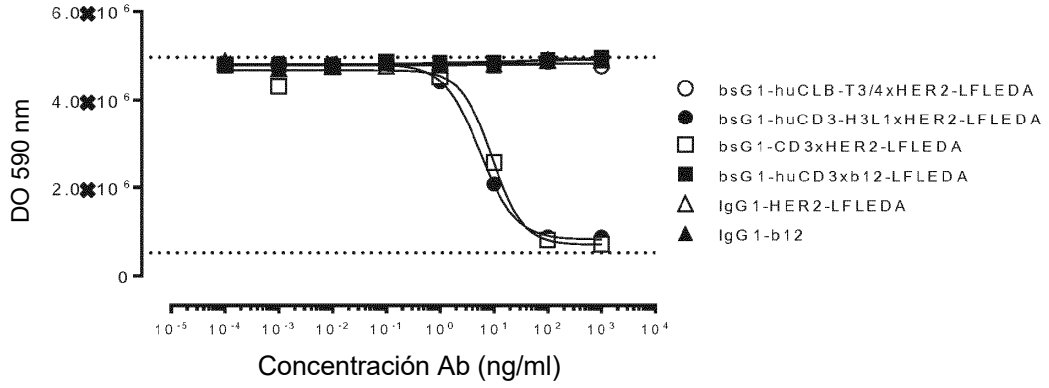
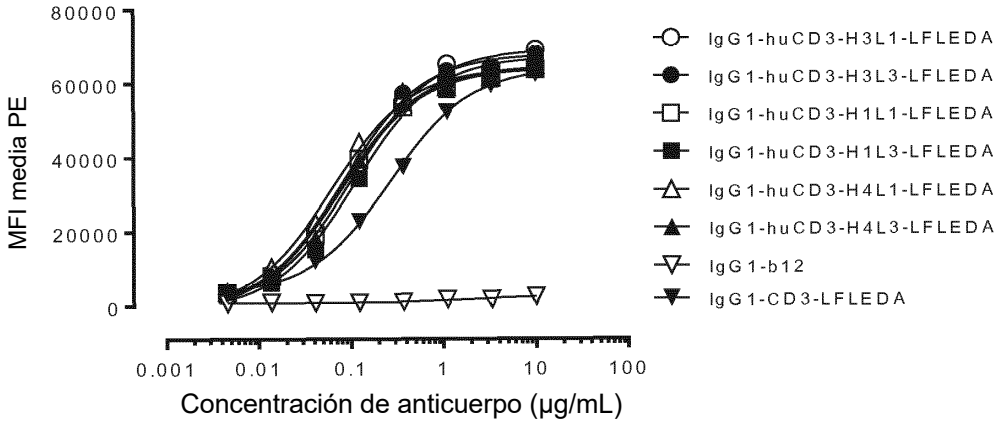

6.0×10 6
4.0×10 6
2.0×10 6
0
DO 590 nm
10 -5 10 -4 10 -3 10 -2 10 -1 10 0 10 1 10 2 10 3 10 4
Concentración Ab (ng/ml)
bsG1-huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA
bsG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA
bsG1-CD3xHER2-LFLEDA
bsG1-huCD3xb12-LFLEDA
IgG1-HER2-LFLEDA
IgG1-b12

Figura 6

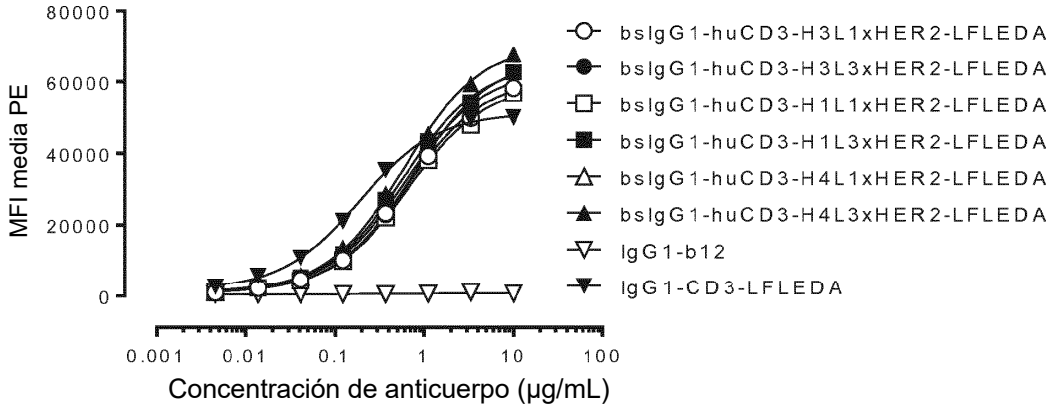
A



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.10
IgG1-huCD3-H3L3- LFLEDA	0.08
IgG1-3huCD3-H1L1- LFLEDA	0.08
IgG1-huCD3-H1L3- LFLEDA	0.11
IgG1-huCD3-H4L1- LFLEDA	0.06
IgG1-huCD3-H4L3- LFLEDA	0.08
IgG1-CD3-LFLEDA	0.27

Figura 6 continuación

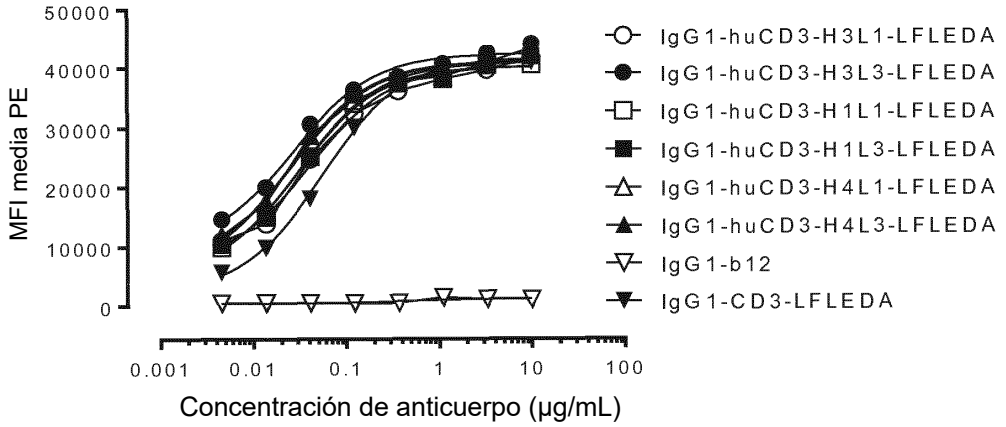
B



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
bsIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.64
bsIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.74
bsIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.66
bsIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.58
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.62
bsIgG1-huCD3-H4L3xHER2-LFLEDA	0.59
IgG1-CD3-LFLEDA	0.18

Figura 7

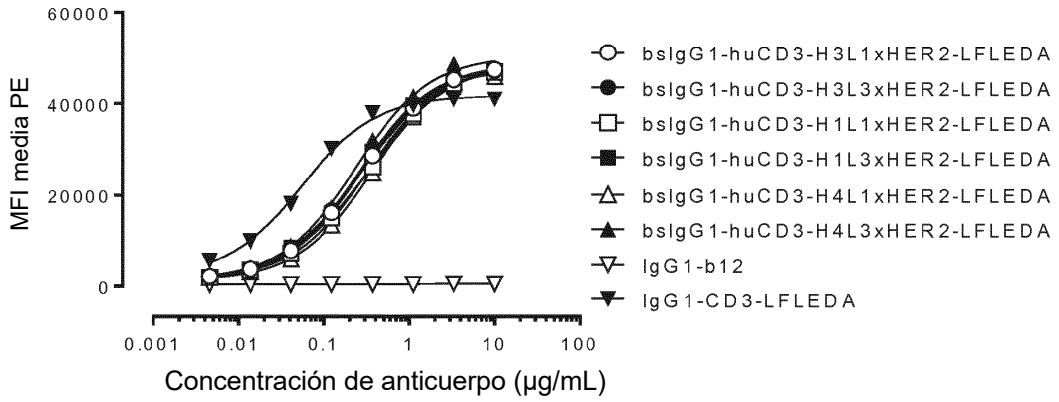
A



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA	0.02
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

Figura 7 continuación

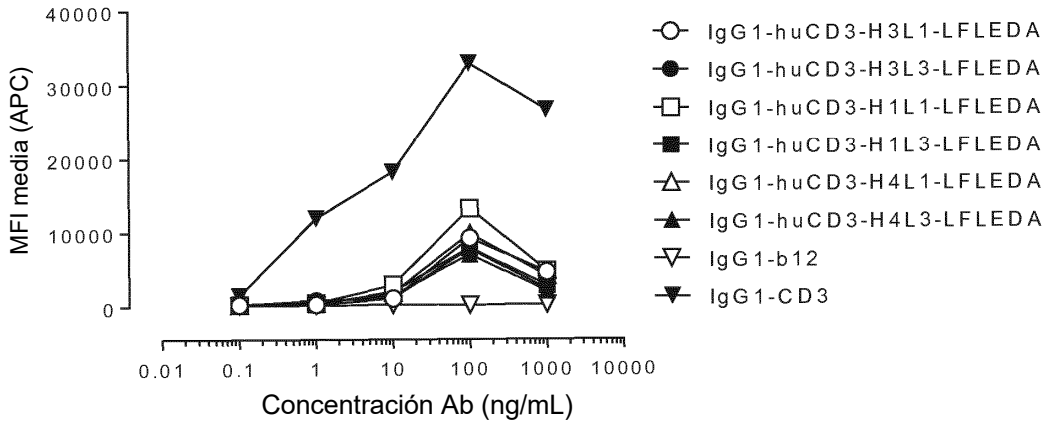
B



Anticuerpo	CE50 (µg/mL)
bsIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
bsIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.26
bsIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.32
bsIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.25
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.36
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.24
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

Figura 8

A


40000
30000
20000
10000
0
MFI media (APC)
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA
IgG1-b12
IgG1-CD3

B

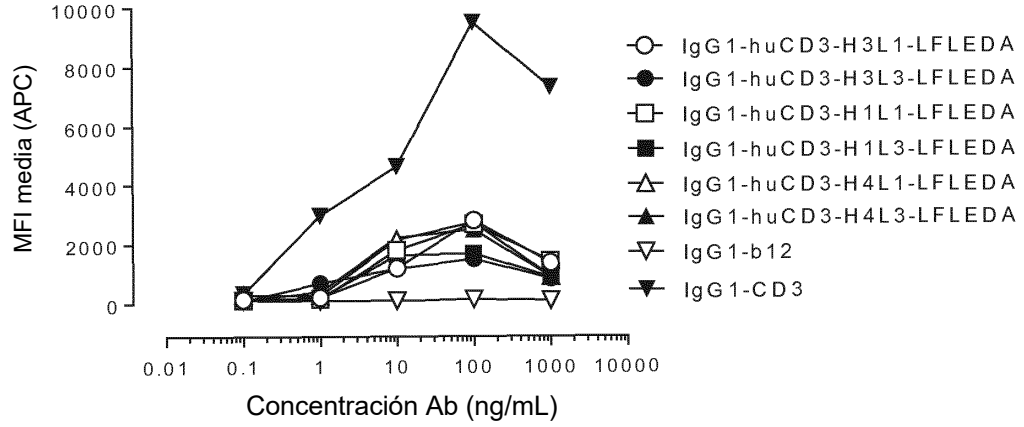
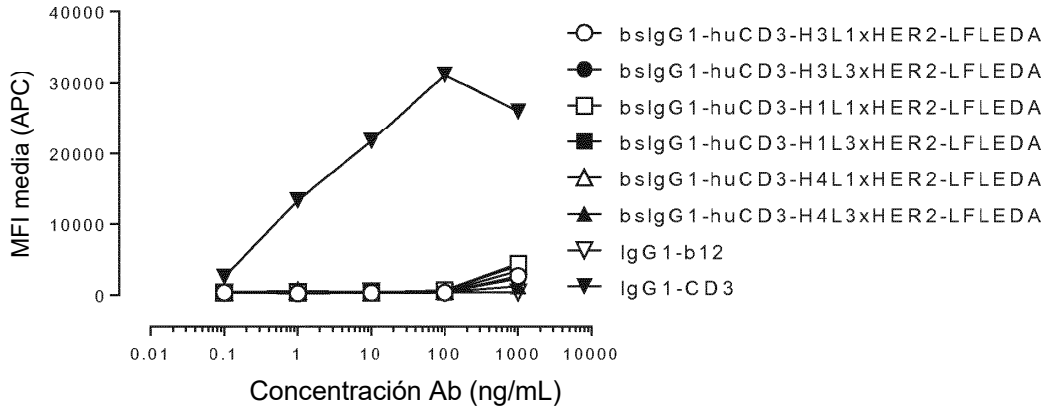

10000
8000
6000
4000
2000
0
MFI media (APC)
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA
IgG1-b12
IgG1-CD3

Figura 8 continuación

C



D

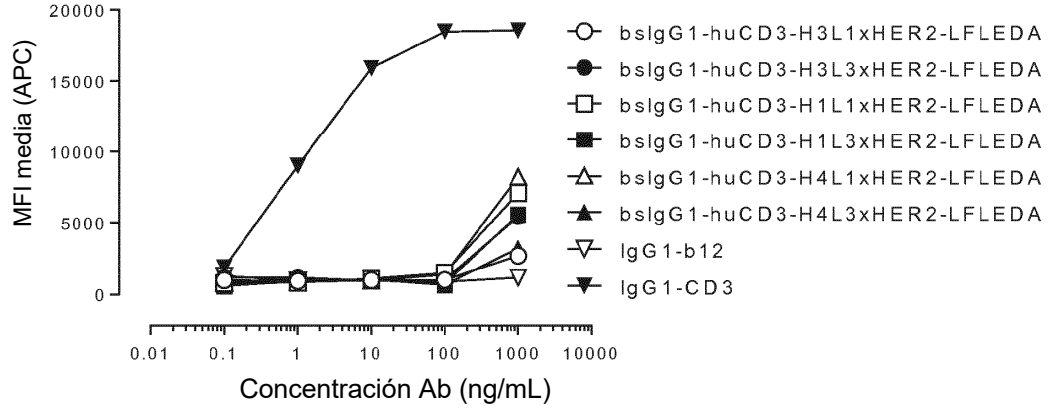
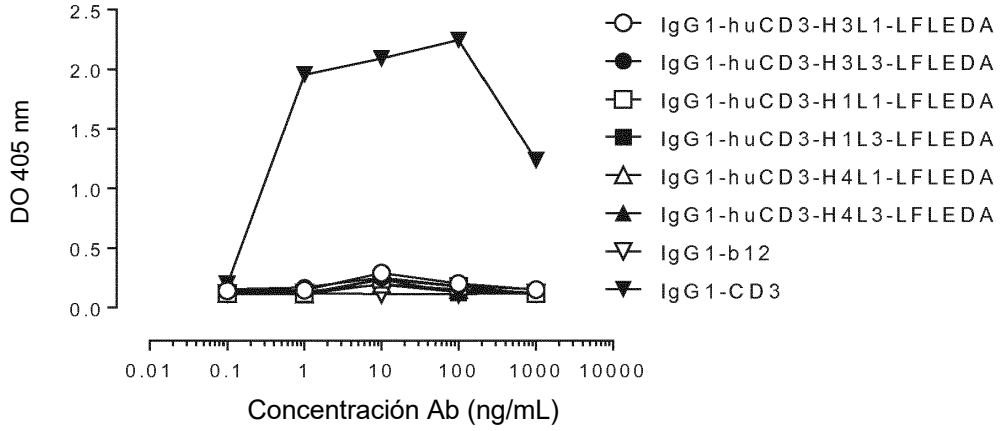


Figura 9

A


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DO 405 nm
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA
IgG1-b12
IgG1-CD3

B

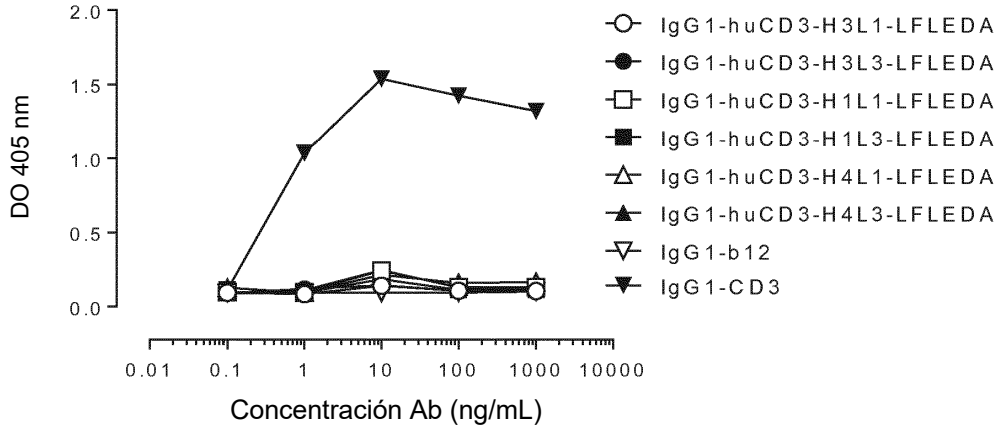
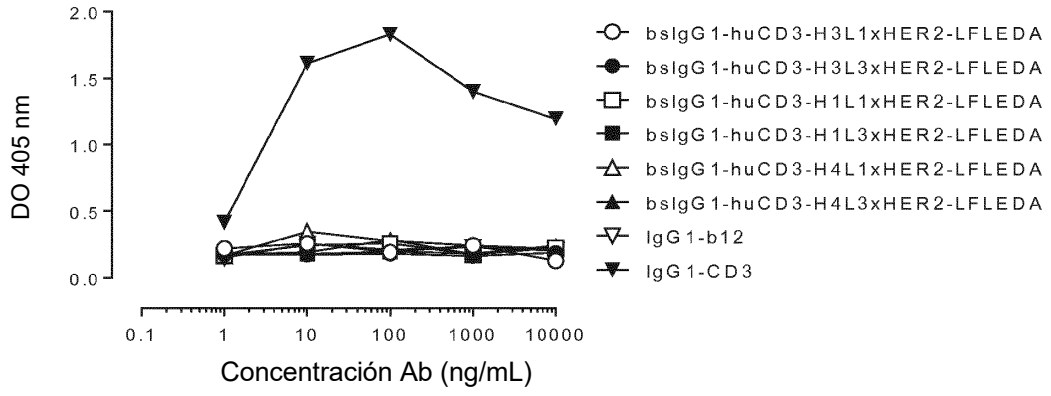

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DO 405 nm
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA
IgG1-b12
IgG1-CD3

Figura 9 continuación

C



D

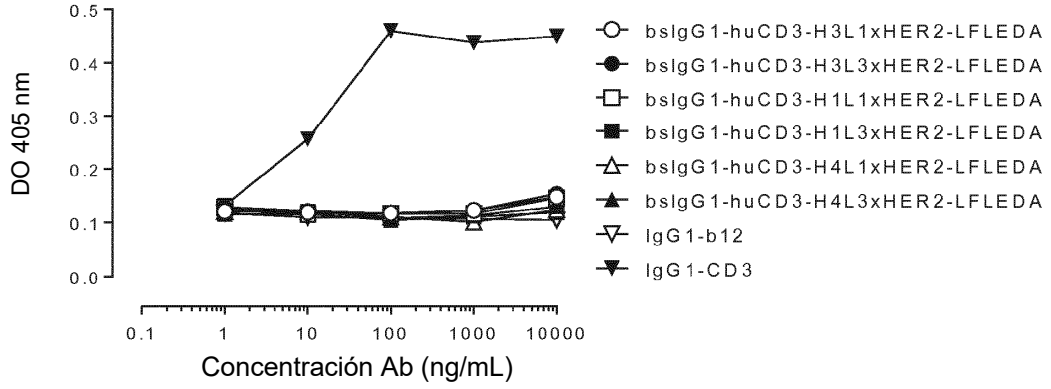
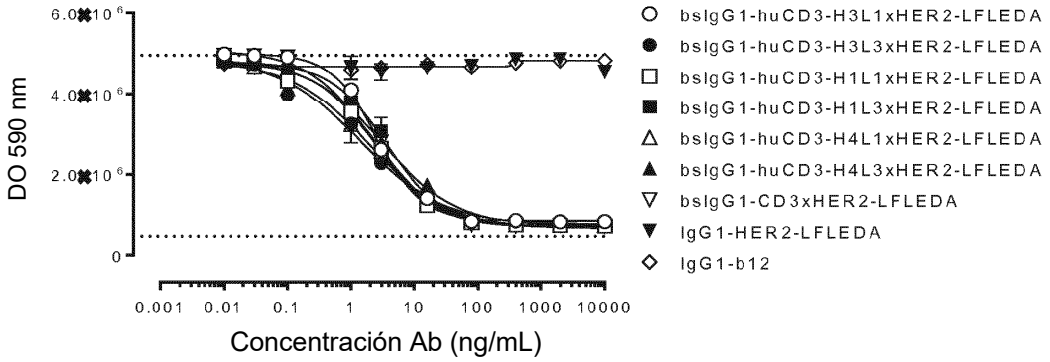


Figura 10

A



B

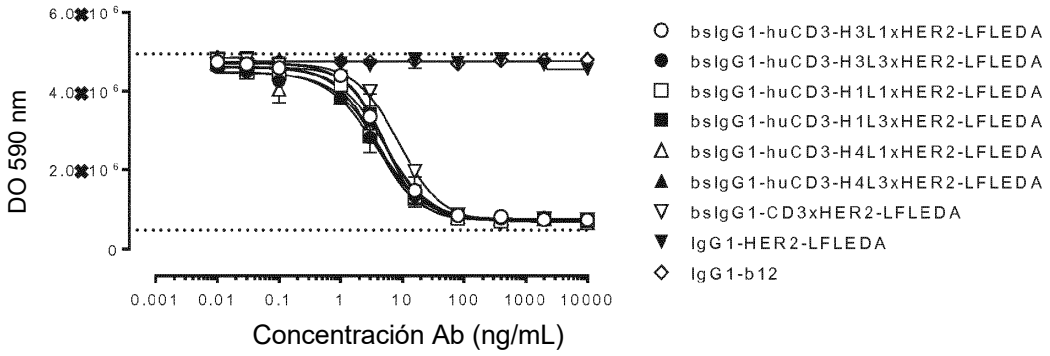


Figure 11

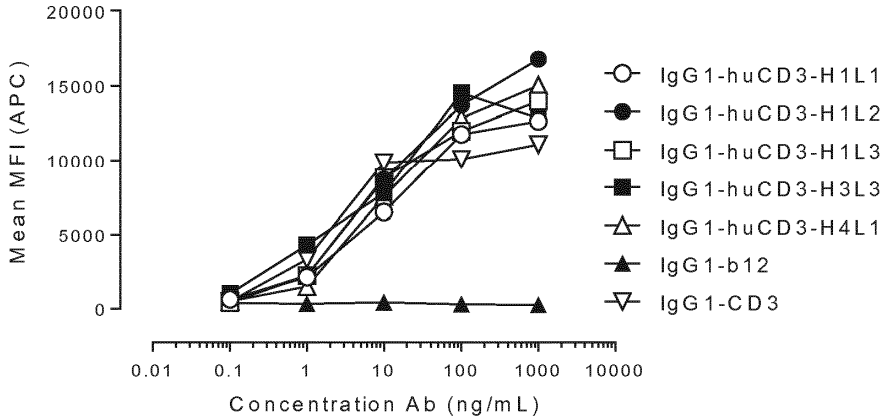
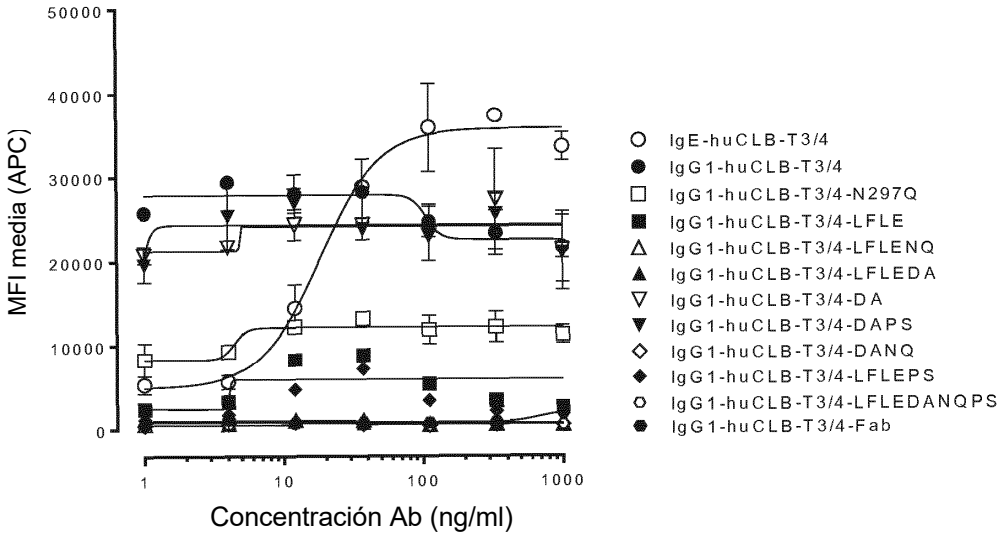


Figura 12

A


50000
40000
30000
20000
10000
0
MFI media (APC)
1
10
100
1000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4-N297Q
IgG1-huCLB-T3/4-LFLE
IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA
IgG1-huCLB-T3/4-DA
IgG1-huCLB-T3/4-DAPS
IgG1-huCLB-T3/4-DANQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS
IgG1-huCLB-T3/4-Fab

B

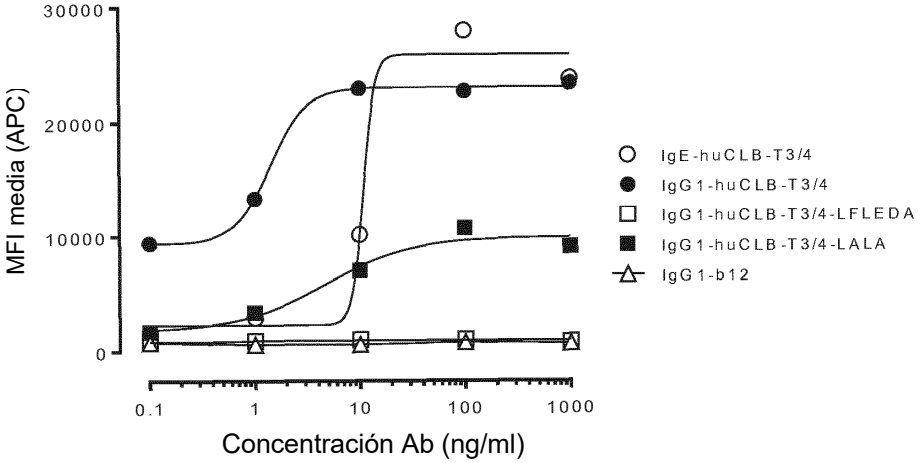
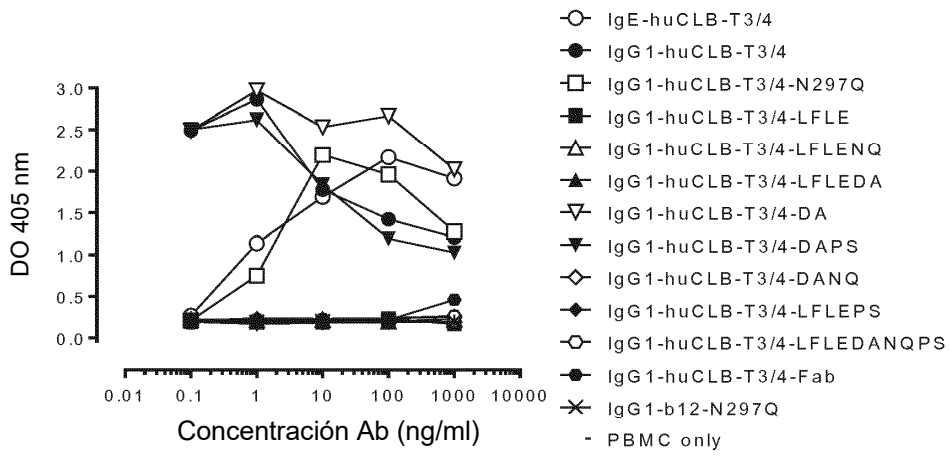

30000
20000
10000
0
MFI media (APC)
0.1
1
10
100
1000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA
IgG1-huCLB-T3/4-LALA
IgG1-b12

Figura 13

A


DO 405 nm
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4-N297Q
IgG1-huCLB-T3/4-LFLE
IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA
IgG1-huCLB-T3/4-DA
IgG1-huCLB-T3/4-DAPS
IgG1-huCLB-T3/4-DANQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS
IgG1-huCLB-T3/4-Fab
IgG1-b12-N297Q
PBMC only

B

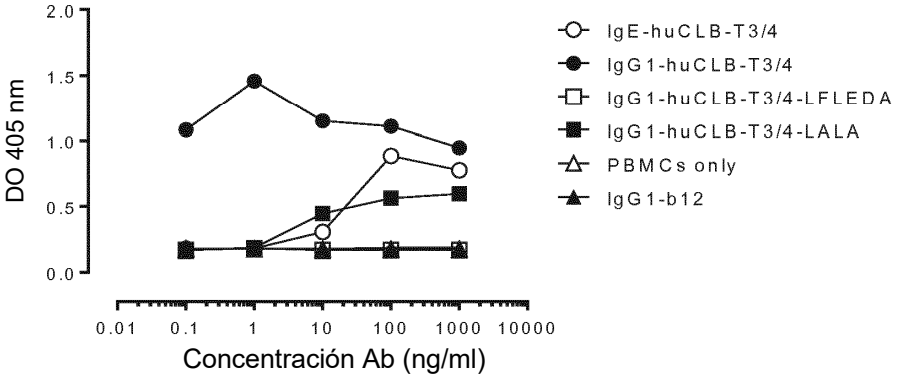
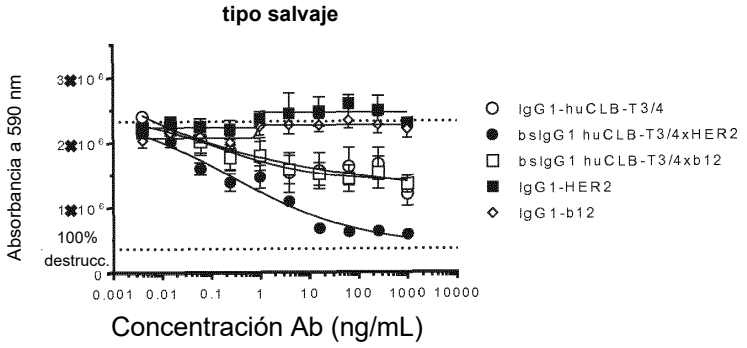

DO 405 nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración Ab (ng/ml)
IgE-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA
IgG1-huCLB-T3/4-LALA
PBMCs only
IgG1-b12

Figura 14

A


tipo salvaje
Absorbancia a 590 nm
3x10^6
2x10^6
1x10^6
100%
destrucc.
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
Concentración Ab (ng/mL)
IgG1-huCLB-T3/4
bsIgG1 huCLB-T3/4xHER2
bsIgG1 huCLB-T3/4xb12
IgG1-HER2
IgG1-b12

B

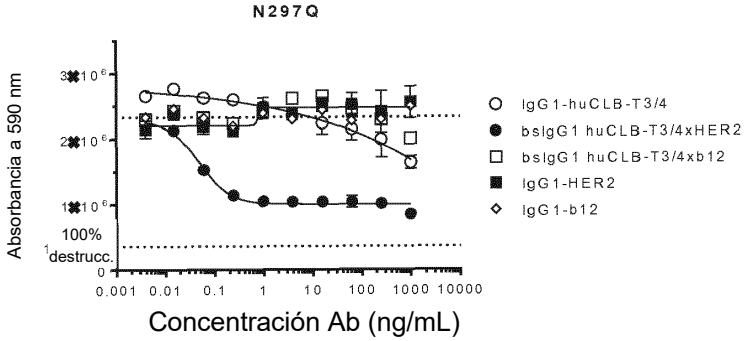
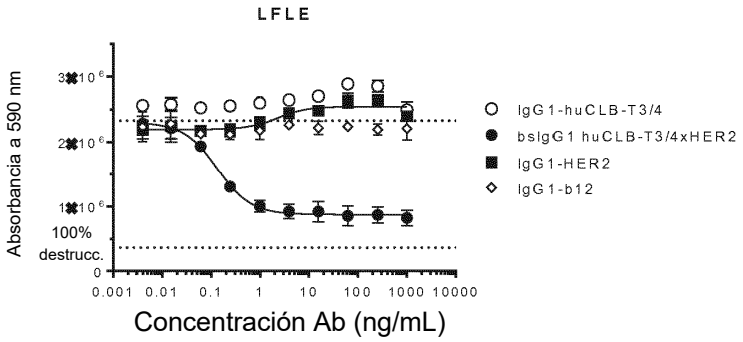

N297Q
Absorbancia a 590 nm
3x10^6
2x10^6
1x10^6
100%
destrucc.
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
Concentración Ab (ng/mL)
IgG1-huCLB-T3/4
bsIgG1 huCLB-T3/4xHER2
bsIgG1 huCLB-T3/4xb12
IgG1-HER2
IgG1-b12

Figura 14 continuación

C



D

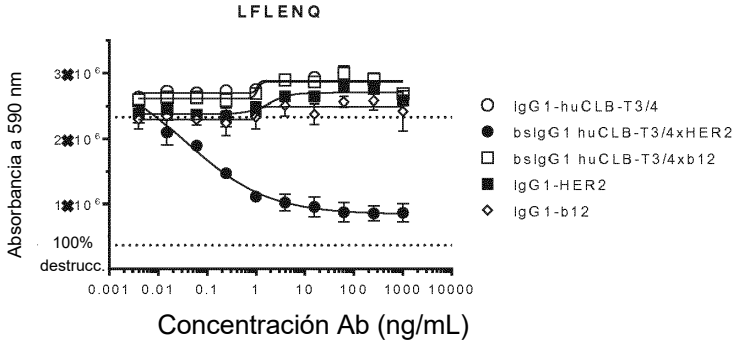
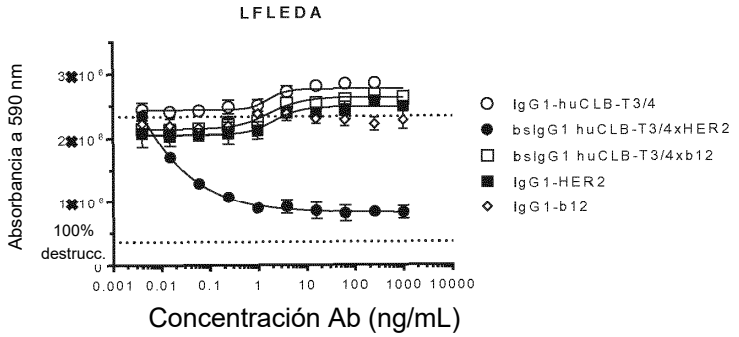
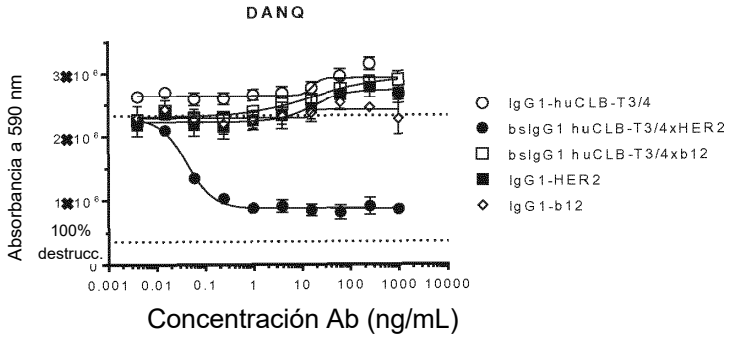


Figura 14 continuación

E



F



G

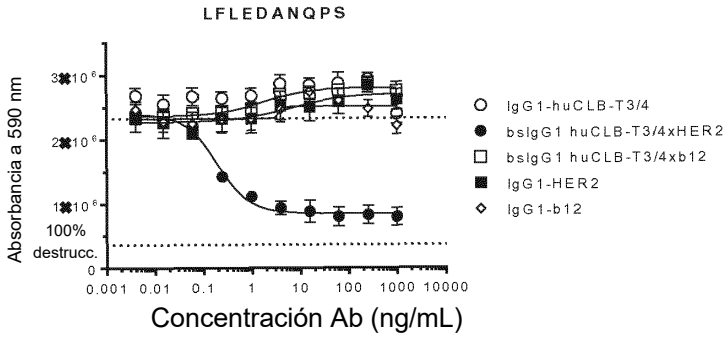
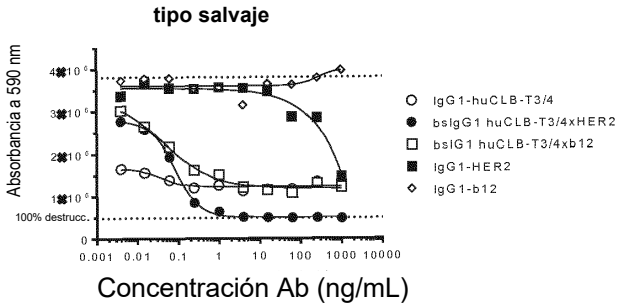
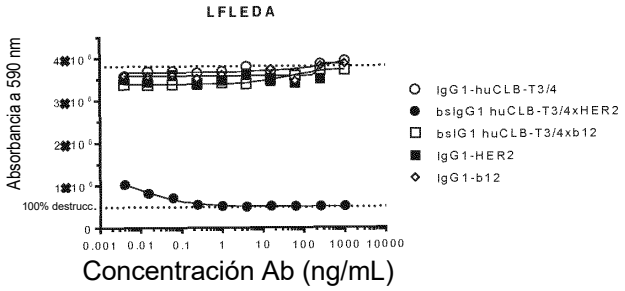


Figura 15

A



B



C

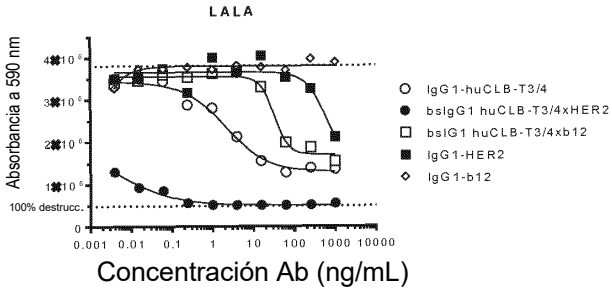
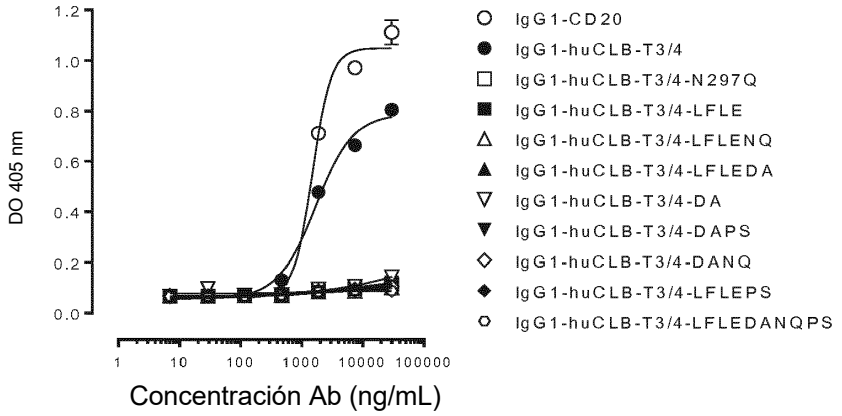


Figura 16

A


1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DO 405 nm
1
10
100
1000
10000
100000
Concentración Ab (ng/mL)
IgG1-CD20
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-huCLB-T3/4-N297Q
IgG1-huCLB-T3/4-LFLE
IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA
IgG1-huCLB-T3/4-DA
IgG1-huCLB-T3/4-DAPS
IgG1-huCLB-T3/4-DANQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS

B

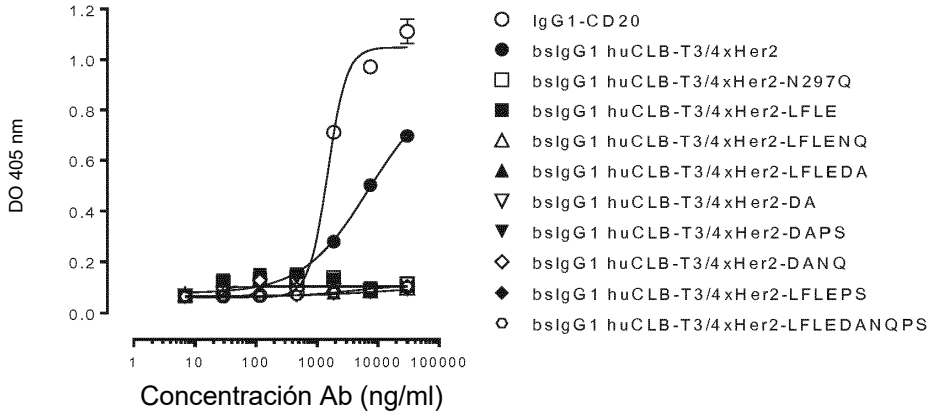
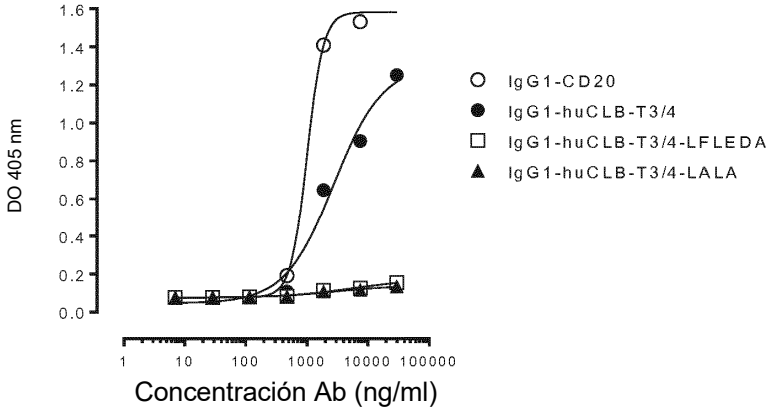

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DO 405 nm
1
10
100
1000
10000
100000
Concentración Ab (ng/ml)
IgG1-CD20
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-N297Q
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-LFLE
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-LFLENQ
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-LFLEDA
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-DA
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-DAPS
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-DANQ
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-LFLEPS
bsIgG1 huCLB-T3/4xHer2-LFLEDANQPS

Figura 16 continuación

C



D

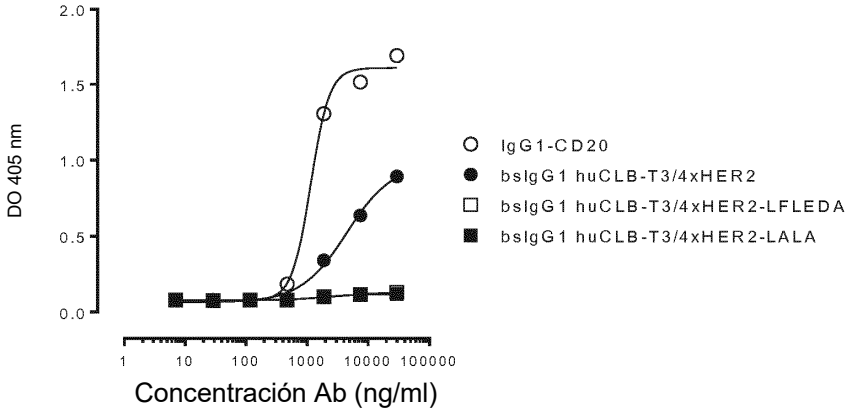
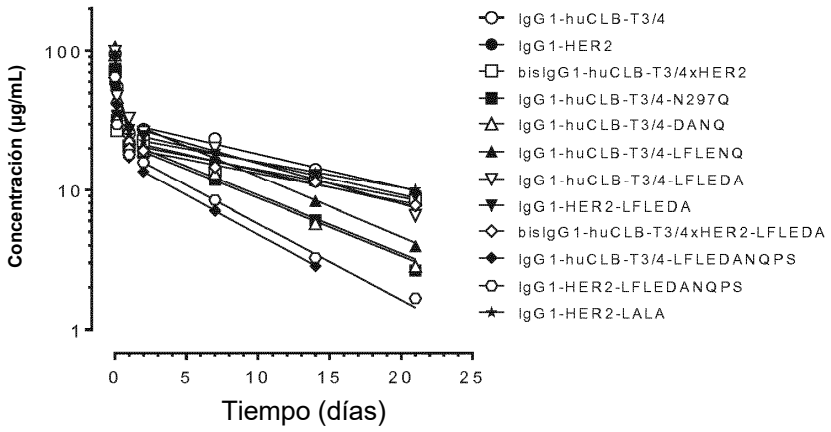


Figura 17

A


Concentración (µg/mL)
100
10
1
0
5
10
15
20
25
Tiempo (días)
IgG1-huCLB-T3/4
IgG1-HER2
bisIgG1-huCLB-T3/4xHER2
IgG1-huCLB-T3/4-N297Q
IgG1-huCLB-T3/4-DANQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA
IgG1-HER2-LFLEDA
bisIgG1-huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA
IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS
IgG1-HER2-LFLEDANQPS
IgG1-HER2-LALA

B

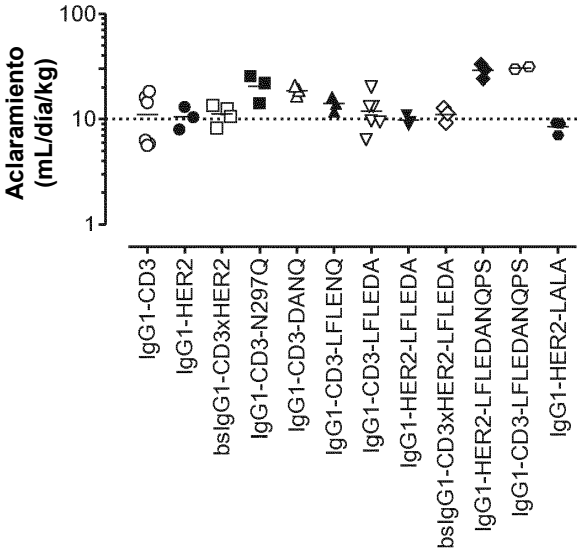

Aclaramiento (mL/día/kg)
100
10
1
IgG1-CD3
IgG1-HER2
bsIgG1-CD3xHER2
IgG1-CD3-N297Q
IgG1-CD3-DANQ
IgG1-CD3-LFLENQ
IgG1-CD3-LFLEDA
IgG1-HER2-LFLEDA
bsIgG1-CD3xHER2-LFLEDA
IgG1-HER2-LFLEDANQPS
IgG1-CD3-LFLEDANQPS
IgG1-HER2-LALA

Figura 18

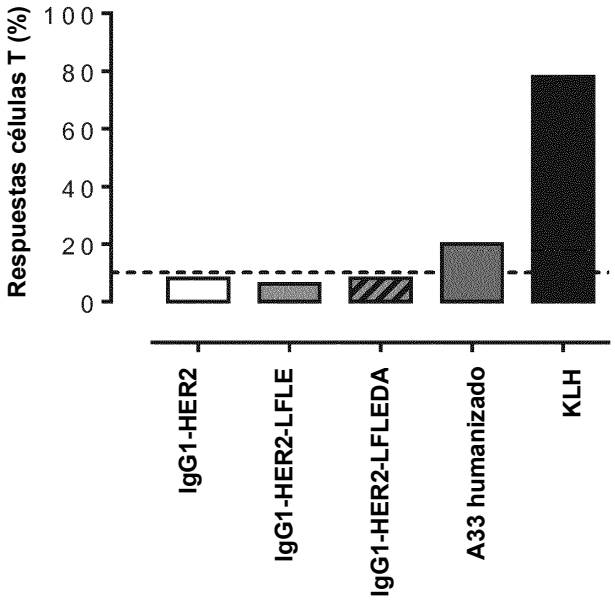

Respuestas células T (%)
100
80
60
40
20
0
IgG1-HER2
IgG1-HER2-LFLE
IgG1-HER2-LFLEDA
A33 humanizado
KLH

Figura 19

VH

```
VH3 EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
VH2 ------------------------------------------------------------------------------------N-------------------------------------- 99%
VH4 ------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------M----- 99%
VH1 ------------Q--G-------------------------------------------------------------------S------N-------------------------------------- 97%
```

VL

```
VL1 QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
VL2 ------------------------------------------------------------------IL-N-------------------------------------- 97%
VL3 ------------------------------------------------------------------IL-N---------------D-Y-------------------- 95%
```