

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 199**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2014 PCT/EP2014/050340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108483**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2014 E 14700200 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2943507**

54 Título: **Formato inerte**

30 Prioridad:

10.01.2013 DK 201300019

10.01.2013 US 201361751045 P

05.07.2013 WO PCT/EP2013/064330

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

10.11.2020

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)

Kalvebod Brygge 43

1560 Copenhagen V, DK

72 Inventor/es:

LABRIJN, ARAN FRANK;

MEESTERS, JOYCE;

NEIJSSSEN, JOOST J.;

VAN DEN BRINK, EDWARD NORBERT;

SCHUURMAN, JANINE y

PARREN, PAUL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 792 199 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

Formato inerte

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas, tales como anticuerpos, que comprenden un primer polipéptido y un segundo polipéptido que son inertes en el sentido de que no inducen ninguna función mediada por el receptor Fc que conduzca a la activación celular, como resultado de tres modificaciones en la región Fc.

10

Antecedentes de la invención

Las funciones efectoras mediadas por la región Fc de un anticuerpo permiten la destrucción de entidades extrañas, tales como la inactivación de patógenos y la eliminación y degradación de antígenos. La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, de sus siglas en inglés) y la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP, de sus siglas en inglés) se inician mediante la unión de la región Fc a las células portadoras de receptores Fc (FcR, de sus siglas en inglés), mientras que la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) se inicia mediante la unión de la región Fc a C1q, que inicia la ruta clásica de activación del complemento.

15

20

Se ha sugerido que las funciones efectoras mediadas por Fc, tales como ADCC y activación del complemento, contribuyen a la eficacia terapéutica de anticuerpos monoclonales utilizados para el tratamiento del cáncer (Weiner et al. Cell 2012, 148:1081-1084).

25

Se han realizado esfuerzos previos para reducir efectos no deseados causados por la unión a la región Fc, por ejemplo, tormenta de citocinas y efectos tóxicos asociados o agregación plaquetaria, mediante la proporción de fragmentos de anticuerpo o anticuerpos con secuencias de aminoácidos mutadas. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos, tales como moléculas Fab, F(ab')₂ o scFv, carecen intrínsecamente de funciones efectoras Fc, pero tienen una semivida *in vivo* corta y pueden requerir modificaciones adicionales para extender la semivida. Tao y Morrison (1989) describen estudios de IgG quimérica humana-de ratón aglucosilada. Bolt et al., (1993) describe la generación de un anticuerpo monoclonal de CD3 humanizado no mitogénico que retiene propiedades inmunosupresoras *in vitro*.

30

Canfield y Morrison (2003) describen que la afinidad de unión de la IgG humana por su receptor Fc de alta afinidad está determinada por múltiples aminoácidos en el dominio CH2 y está modulada por la región bisagra.

35

Hezarah et al., (2001) describe actividades de la función efectora de un panel de mutantes de un anticuerpo ampliamente neutralizante contra el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

40

Armour et al. (2003) describe la unión diferencial a receptores humanos FcγRIIIa y FcγRIIb mediante anticuerpos humanos de IgG de tipo silvestre y mutantes.

Idusogie et al., (2000) describe el mapeo del sitio de unión de C1q en rituxan, un anticuerpo quimérico con un Fc de IgG1 humana.

45

Shields et al., (2001) describe el mapeo de alta resolución del sitio de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y el diseño de variantes de IgG1 con unión mejorada al FcγR.

50

Oganesyan et al., (2008) describe la caracterización estructural de un fragmento Fc humano genomanipulado para carecer de funciones efectoras.

Duncan et al., (2008) describe la localización del sitio de unión para el receptor Fc humano de alta afinidad en IgG.

55

Parren et al., (1992) describe la interacción de subclases de IgG con el Fc gamma RIIa (CD32) de baja afinidad en monocitos, neutrófilos y plaquetas humanos.

Newman et al., (2001) describe la modificación de la región Fc de un anticuerpo de IgG primatizado contra CD4 humano que conserva su capacidad de modular receptores CD4 pero no agota los linfocitos T CD4(+) en los chimpancés.

60

Como alternativa, se ha informado que la región bisagra del anticuerpo es importante con respecto a las interacciones con los FcγR y el complemento. Dall'Acqua et al., (2006) describe la modulación de las funciones efectoras de una IgG1 humana a través de la genomanipulación de su región bisagra. Sin embargo, ninguna de las regiones Fc previamente genomanipuladas están completamente desprovistas de funciones mediadas por Fc. Además, a menudo se desconoce el impacto de estas mutaciones específicas sobre la inmunogenicidad y la semivida *in vivo*.

65

El documento WO 2012/143524 se refiere a anticuerpos biespecíficos contra HER2 y CD3. El documento WO2012/113813 se refiere a anticuerpos contra IL33R humano y usos de los mismos. Hinojosa et al., (Hybridoma 29:2 (2010): 115-124) se refiere a la construcción de un anticuerpo anti-CD3 humano no mitógeno recombinante. Bohua y et al., (Immunology 116:4 (2005): 487-498) se refiere a la construcción y caracterización de un anticuerpo monoclonal 12F6 humanizado anti-CD3 humano con funciones inmunorreguladoras eficaces. Woodle et al., (Transplantation 68:5 (1999): 608-616) se refiere a un ensayo de fase I de un anticuerpo de OKT3 humanizado, no unido al receptor de Fc, huOKT3γ1 (Ala-Ala) en el tratamiento del rechazo agudo de aloinjerto renal. Li et al. (mabs. Vol. 2. N.º 4. Taylor & Francis, 2010) se refiere a un ensayo de fase I de un anticuerpo anti-CD3 humanizado, no unido al receptor Fc, hu12F6mu en pacientes que reciben aloinjertos renales.

Como se ha descrito anteriormente, existe una necesidad de proteínas incapaces de inducir una gama de funciones efectoras específicas y al mismo tiempo que tengan propiedades farmacocinéticas conservadas. La presente invención se refiere a dichas proteínas.

15 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a proteínas y anticuerpos que tienen una región Fc no activadora en comparación con una proteína o anticuerpo de tipo silvestre. Sin desear quedar limitados a teoría alguna, se cree que las proteínas y los anticuerpos son incapaces de inducir una gama de funciones efectoras causadas por la interacción entre la región Fc y componentes efectoras, tales como la unión al receptor Fc.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una proteína que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde dicho primer y segundo polipéptido comprende cada uno al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 humana, donde tanto en dicho primer como segundo polipéptido los aminoácidos en las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 de la cadena pesada de IgG1 humana, son F, E, A, N y P, respectivamente, donde las posiciones de aminoácidos están numeradas de acuerdo con el índice EU de numeración.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una proteína de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona una proteína, composición o composición farmacéutica de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Curvas de unión de variantes de anticuerpos monoespecíficos de IgG1-CD3 (IgG1-huCLB-T3/4-F405L) o de IgG1-HER2 (IgG1-HER2-169-K409R) y variantes de anticuerpos biespecíficos de bsIgG1-CD3xHER2 (IgG1-huCLB-T3/4xHER2-169) a su diana específica en células Jurkat (**Figura 1A, B**) o células AU565 (**Figura 1C, D**). Los datos mostrados son intensidades medias de fluorescencia (IMF) de un experimento representativo para cada línea celular, como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 2: Curvas de unión de variantes de anticuerpos monoespecíficos de IgG1-CD3 (IgG1-huCLB-T3/4-F405L) o de IgG1-HER2 (IgG1-HER2-169-K409R) y variantes de anticuerpos biespecíficos de bsIgG1-CD3xHER2 (IgG1-huCLB-T3/4 x HER2-169) a su diana específica en células Jurkat (**Figura 2A y 2B**) o células AU565 (**Figura 2C y 2D**). Los datos mostrados son intensidades medias de fluorescencia (IMF) de un experimento representativo para cada línea celular, como se describe en el Ejemplo 2.

Figura 3: Análisis FACS de la expresión de CD69 en linfocitos T en cultivos de PBMC como se describe en el Ejemplo 3. Los cultivos de PBMC se trataron con variantes de anticuerpos de IgG1-CD3 (huCLB-T3/4) titulados. Se muestran ejemplos representativos de tres experimentos.

Figura 4: Proliferación de linfocitos T medida en ELISA como se describe en el Ejemplo 4. Las PBMC se incubaron con variantes de anticuerpos durante tres días. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Figura 5: Se determinó la inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T mediante variantes de tipo silvestre y de anticuerpos (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ, LFLEDANQPS (**Figura 5A-G**)) como se describe en el Ejemplo 5. Se muestran los promedios de un experimento realizado dos veces.

Figura 6: Se determinó la inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T mediante variantes de tipo silvestre y de anticuerpos (LFLEDA, LALA (**Figura 6A-C**)) como se describe en el Ejemplo 5. Se muestran los promedios de dos experimentos realizados dos veces.

Figura 7: Liberación de citocinas en el sobrenadante tras la incubación de células tumorales y PBMC con variantes de anticuerpos monoespecíficos de IgG1-CD3 o biespecíficos de IgG-CD3xHER2 como se describe en el Ejemplo 5 (incubación con GM-CSF (**Figura 7A**), IFNγ (**Figura 7B**), IL-1β (**Figura 7C**), IL-2 (**Figura 7D**), IL-6 (**Figura 7E**), IL-8 (**Figura 7F**), IL-10 (**Figura 7G**), IL-12 (**Figura 7H**), y TNFα (**Figura 7I**)).

Figura 8: La unión de C1q a IgG1-CD3 monoespecífica (**Figura 8A, 8C**) e IgG1-CD3xHER2 biespecífica (**Figura**

8B, 8D), y sus variantes de anticuerpos no activadores se evaluaron mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados son representativos de los experimentos realizados dos veces.

Figura 9: La unión de las variantes de anticuerpos de IgG1-CD3 (**Figura 9A**) N297Q, LFLE, LFLEDA, LFLENQ, DANQ y LFLEDANQPS y (**Figura 9B**) LFLEDA y LALA al FcγRI de alta afinidad se evaluó mediante análisis FACS como se describe en el Ejemplo 8. Se muestran los promedios de dos experimentos.

Figura 10: El análisis farmacocinético (PK, de sus siglas en inglés) de las variantes de anticuerpos no activadores se comparó con el del anticuerpo de IgG1-CD3 de tipo silvestre como se describe en el Ejemplo 9. La **Figura 10A** muestra la concentración plasmática de IgG1 humana representada frente al tiempo. La **Figura 10B** muestra la tasa de eliminación plasmática calculada como se describe en el Ejemplo 9. La línea de puntos horizontal representa la tasa de eliminación promedio de los anticuerpos de IgG1 humanas en ratones SCID (10 ml/día/kg).

Figura 11: Curvas de unión de (**Figura 11A**) variantes de anticuerpos monoespecíficos de IgG1-huCD3 y (**Figura 11B**) variantes de anticuerpos biespecíficos de bsIgG1 huCD3xHER2 a la línea de linfocitos T humanos Jurkat. Los datos mostrados son intensidades medias de fluorescencia (IMF) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 10. Las tablas muestran las concentraciones de anticuerpos (μg/ml) que dan como resultado una unión media máxima (CE50).

Figura 12: Curvas de unión de (**Figura 12A**) variantes de anticuerpos monoespecíficos de IgG1-huCD3 y (**Figura 12B**) variantes de anticuerpos biespecíficos de bsIgG1 huCD3xHER2 a la línea de linfocitos T de macaco cangrejero HCS-F. Los datos mostrados son intensidades medias de fluorescencia (IMF) de un experimento representativo, como se describe en el Ejemplo 10.

Figura 13: Las variantes de anticuerpos de IgG1-huCD3 se valoraron en PBMC. La expresión de CD69 en linfocitos T en cultivo de PBMC se midió mediante análisis FACS, como se describe en el Ejemplo 11. Estos experimentos se realizaron dos veces y se muestran resultados representativos de un experimento.

Figura 14: Las PBMC humanas (**Figura 14A**) o de macaco cangrejero (**Figura 14B**) se incubaron con variantes de anticuerpos de IgG1-huCD3 durante tres días, después de lo cual se midió la proliferación mediante un ELISA de proliferación celular, como se describe en el Ejemplo 12. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Figura 15: Se determinó la inducción de citotoxicidad mediada por linfocitos T humanos (**Figura 15A**) y de macaco cangrejero (**Figura 15B**) mediante las variantes de anticuerpos de CD3 humanizados (huCD3) con mutaciones LFLEDA no activadoras como se explica en el Ejemplo 13. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes realizados dos veces.

Descripción detallada de la invención

Como se describe en el presente documento, las modificaciones específicas en posiciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo han demostrado ser modificaciones no activadoras que hacen que la proteína sea inerte. Específicamente, se ha demostrado que una realización particular tiene una tasa de eliminación plasmática *in vivo* comparable a la tasa de eliminación plasmática del anticuerpo de tipo silvestre.

El término "no activador", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la inhibición o abolición de la interacción de una proteína con receptores Fc (FcR) presentes en una amplia gama de células efectoras, tales como monocitos, o con C1q para activar la vía del complemento.

La expresión "región Fc", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una región que comprende, en la dirección desde el extremo N al C, al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3.

La presente invención se refiere en un aspecto a una proteína que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde dicho primer y segundo polipéptido comprende cada uno al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 humana, donde tanto en dicho primer como segundo polipéptido los aminoácidos en las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 de la cadena pesada de IgG1 humana, son F, E, A, N y P, respectivamente, donde las posiciones de aminoácidos están numeradas de acuerdo con el índice EU de numeración.

El término "proteína", como se usa en el presente documento, pretende referirse a moléculas biológicas grandes que comprenden una o más cadenas de aminoácidos unidas entre sí mediante enlaces peptídicos. Una cadena única de aminoácidos también puede denominarse "polipéptido". Por lo tanto, una proteína, en el contexto de la presente invención, puede consistir en uno o más polipéptidos. La proteína puede ser cualquier tipo de proteína, tal como un anticuerpo o una variante de un anticuerpo precursor.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de ellos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas normales con una semivida de períodos de tiempo significativos, tales 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

relevante definido funcionalmente (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 tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). La región de unión (o dominio de unión que puede usarse en el presente documento, ambos con 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 (Ac) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, que incluyen varias células del sistema inmunitario (tales como células efectoras) y componentes del sistema del complemento, tales como C1q, el primer componente en la vía clásica de activación del complemento. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo, en el presente documento, 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 unirse, al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados 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 unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios V_H y C_H1 ; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio V_H y también llamado anticuerpos de dominio (Holt et al; Trends Biotechnol. noviembre de 2003; 21(11):484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Revetz et al; Expert Opin Biol Ther. enero de 2005; 5.(1):111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador 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), véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos de cadena sencilla están abarcados en el término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o se indique claramente por contexto. Aunque dichos fragmentos generalmente se incluyen dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son únicos, exhibiendo diferentes propiedades biológicas y utilidad. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique otra cosa, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (AcM), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como 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.

Cuando el anticuerpo es un fragmento, tal como un fragmento de unión, debe entenderse dentro del contexto de la presente invención que dicho fragmento está fusionado a una región Fc como se describe en el presente documento. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser una proteína de fusión que cae dentro del alcance de la invención. Por lo tanto, en una realización, la proteína es una proteína de fusión.

La expresión "cadena pesada de inmunoglobulina" o "cadena pesada de una inmunoglobulina", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina. Una cadena pesada está compuesta normalmente por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como CH) que define el isotipo de la inmunoglobulina. La región constante de cadena pesada normalmente está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. El término "inmunoglobulina", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro potencialmente interconectados mediante enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada (véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Dentro de la estructura de la inmunoglobulina, las dos cadenas pesadas están interconectadas a través de enlaces disulfuro en la llamada "región bisagra". Igualmente que las cadenas pesadas, cada cadena ligera está compuesta normalmente por varias regiones; una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera normalmente está compuesta por un dominio, CL. Además, las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR, de sus siglas en inglés). Cada VH y VL se compone normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Lefranc MP et al, Dev Comp Immunol Jan:27(1):55-77 (2003)).

La expresión "anticuerpo de longitud completa" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo precursor o variante) que contiene todos los dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera correspondientes a los que normalmente se encuentran en un anticuerpo de tipo silvestre de ese isotipo.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones, inserciones o deleciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

La expresión "primer polipéptido" y "segundo polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de polipéptidos que pueden ser idénticos o diferentes en la secuencia de aminoácidos. A menos que se declare o indique lo contrario, en el caso de una proteína de tipo silvestre, el primer y el segundo polipéptido tienen secuencias de aminoácidos idénticas.

El término "isotipo", como se usa en el presente documento, 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) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada. Por lo tanto, la proteína puede comprender una cadena pesada de una inmunoglobulina de la clase IgG1 o cualquier alotipo de la misma. Además, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ), o con cualquier alotipo de las mismas.

La expresión "región bisagra", como se usa en el presente documento, se refiere a la región bisagra de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo, la región bisagra de un anticuerpo de IgG1 humana corresponde a los aminoácidos 216-230 de acuerdo con la numeración Eu como se establece en Kabat (descrito en Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5ª edición-US Department of Health and Human Services, publicación NIH N.º 91-3242, págs. 662,680,689 (1991)).

La expresión "región CH2" o "dominio CH2", como se usa en el presente documento, se refiere a la región CH2 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo de IgG1 humana corresponde a los aminoácidos 231-340 de acuerdo con el sistema de numeración Eu. Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en el presente documento.

La expresión "región CH3" o "dominio CH3", como se usa en el presente documento, se refiere a la región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo de IgG1 humana corresponde a los aminoácidos 341-447 de acuerdo con el sistema de numeración Eu. Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros subtipos como se describe en el presente documento.

La expresión "aminoácido correspondiente a las posiciones", como se usa en el presente documento, 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 el presente documento de acuerdo con el índice de numeración Eu (descrito en Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5ª edición - US Department of Health and Human Services, publicación NIH N.º 91-3242, págs. 662,680,689 (1991)). Por lo tanto, un aminoácido o segmento en una secuencia que "corresponde a" un aminoácido o segmento en otra secuencia es uno que se alinea con el otro aminoácido o segmento usando un programa de alineación de secuencia estándar tal como ALIGN, ClustalW o similar, normalmente en configuración predeterminada y tiene al menos un 50 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 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.

En el contexto de la presente divulgación, el aminoácido puede definirse por una clase conservadora o no conservadora. Por lo tanto, las clases de aminoácidos pueden reflejarse en una o más de las siguientes tablas:

Resto de aminoácidos de clase conservadora

Restos ácidos	D y E
Restos básicos	K, R y H
Restos hidrófilos sin carga	S, T, N y Q
Restos alifáticos sin carga	G, A, V, L e I
Restos apolares sin carga	C, M y P
Restos aromáticos	F, Y y W

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de restos de aminoácidos

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

En el contexto de la presente divulgación, una sustitución en una proteína se indica como:

Aminoácido original - posición - aminoácido sustituido;

5

En referencia a la nomenclatura bien reconocida para aminoácidos, se usa el código de tres letras o un código de letras, que incluyen los códigos Xaa y X para indicar cualquier resto de aminoácido. En consecuencia, la notación "L234F" o "Leu234Phe" significa que la proteína comprende una sustitución de leucina con fenilalanina en la posición de aminoácido de proteína correspondiente al aminoácido en posición 234 en la proteína de tipo silvestre.

10

La sustitución de un aminoácido en una posición dada por cualquier otro aminoácido se denomina:

Aminoácido original - posición; o, por ejemplo, "L234".

15

Para una modificación donde 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 "L234F,R,K,W" o "L234F/R/K/W" o "L234 a F, R, K o W"

20

Dicha designación puede usarse indistintamente en el contexto de la divulgación, pero tiene el mismo significado y propósito.

25

Además, la expresión "una sustitución" abarca una sustitución en uno 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, 234I, 234K, 234M, 234N, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234P y 234Y. Esto es, de hecho, equivalente a la designación 234X, donde la X designa cualquier aminoácido que no sea el aminoácido original. Estas sustituciones también se pueden designar 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 el presente documento, para incluir específicamente en el presente documento una cualquiera de dichas sustituciones. Es bien conocido en la técnica cuando una secuencia de aminoácidos comprende un "X" o "Xaa", dicho X o Xaa representa cualquier aminoácido. Por lo tanto, X o Xaa pueden representar normalmente cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural. La expresión "de origen natural" como se usa en el presente documento, se refiere a uno cualquiera de los siguientes restos de aminoácidos; glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, prolina, triptófano, fenilalanina, tirosina, metionina y cisteína.

35

Los términos "aminoácido" y "resto de aminoácido" pueden usarse indistintamente.

40

De acuerdo con la presente invención, tanto en dicho primer como segundo polipéptido los aminoácidos en las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 de la cadena pesada de IgG1 humana, son F, E, A, N y P, respectivamente, donde las posiciones de aminoácidos están numeradas de acuerdo con el índice EU de numeración.

45

En el presente documento también se divulga una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos el aminoácido en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es L, L y D, respectivamente, y donde los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana no han sido sustituidos. En este contexto, la expresión "no ha sido sustituido" se refiere a los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana que no han sido sustituidos con otro aminoácido de origen natural o no natural. Por lo tanto, un aminoácido "no ha sido sustituido" en una posición correspondiente a la posición en una cadena pesada de IgG1 humana significa que el aminoácido en la posición particular es el mismo que el aminoácido de origen natural en una cadena pesada de IgG1 humana.

50

Las funciones efectoras mediadas por Fc forman parte de la actividad biológica de las moléculas de inmunoglobulina G humana (IgG). Ejemplos de dichas funciones efectoras incluyen, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) que se desencadenan por la unión de diversas moléculas efectoras a la región Fc. En el contexto de la presente divulgación, "unión a 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. Las expresiones "unión a FcR" y "unión a FcR1" se refieren a la unión a, o con, una región Fc al receptor gamma Fc y al receptor gamma Fc I, respectivamente. En algunos casos, cuando un anticuerpo de CD3 se une a linfocitos T, la región Fc del anticuerpo de CD3 se une a los FcR presentes en otras células, por ejemplo, monocitos, lo que conduce a la activación del linfocito T. Dicha activación no dirigida de linfocitos T puede no ser deseada. Sin embargo, la activación de linfocitos T dirigida puede ser altamente deseable para el tratamiento de una gama de indicaciones, tales como cáncer. La dirección de linfocitos T a células específicas, por ejemplo, células tumorales, puede facilitarse mediante el uso de un anticuerpo biespecífico, donde una de las regiones de unión se une a CD3 presente en el linfocito T y la otra región de unión se une a un antígeno diana específico, por ejemplo, en una célula tumoral. La activación de linfocitos T dirigidos no deseada a través de la reticulación mediada por Fc debe evitarse y puede desactivarse haciendo que la región Fc sea inerte para dicha actividad. Por lo tanto, se evita la interacción entre dicha región Fc inerte con los receptores Fc presentes. Se ha demostrado que un anticuerpo de la presente invención es completamente inerte cuando se prueba en varios ensayos diferentes, es decir, véanse los Ejemplos 3 a 9 y 11 a 13. El anticuerpo de CD3 que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A, como se describe en los Ejemplos, mostró anulación de la proliferación de linfocitos T mediada por Fc, expresión de CD69 mediada por Fc en linfocitos T, destrucción inespecífica y liberación de citocinas en un ensayo de citotoxicidad, así como unión *in vitro* a C1q. De manera similar, el anticuerpo que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y N297Q mostró resultados comparables. Por lo tanto, una proteína, tal como un anticuerpo, de la presente invención muestra claramente resultados superiores en varios ensayos en comparación con una proteína de tipo silvestre.

El término "inercia química", "inerte" o "no activadora", como se usa en el presente documento, se refiere a una región Fc que al menos no es capaz de unirse a ningún receptor de Fcγ, inducir la reticulación mediada por Fc de FcR o inducir la reticulación mediada por FcR de antígenos diana a través de dos regiones Fc de proteínas individuales, tales como anticuerpos, o no es capaz de unirse a C1q.

El término "reticulación", como se usa en el presente documento, se refiere a la formación de puentes entre dos proteínas, que pueden ser proteínas de superficie, mediante la interacción bivalente de un anticuerpo o la formación de puentes entre dos proteínas que están unidas mediante anticuerpos a través de la interacción de las regiones Fc del anticuerpo con una célula portadora de FcR o la formación de puentes entre receptores Fc a los que se unen anticuerpos mediante la interacción del anticuerpo con su antígeno diana en las células portadoras de antígeno diana.

La expresión "destrucción inespecífica", como se usa en el presente documento, se refiere a la destrucción de células mediante la función citotóxica de linfocitos T u otras células efectoras, a través de la activación independiente de antígeno diana tumoral de dichas células.

El término "proliferación", como se usa en el presente documento, se refiere al crecimiento celular en los contextos de desarrollo celular y división celular.

Por lo tanto, la proteína de la presente invención puede ser una que no permita la activación de linfocitos T mediada por Fc, no induzca el sistema del complemento, no se una a los receptores de Fcγ, pero al mismo tiempo tenga una tasa de eliminación plasmática comparable a la tasa de eliminación plasmática de una proteína de tipo silvestre. Dicha proteína también puede usarse en un formato biespecífico.

Por lo tanto, la proteína puede tener una tasa de eliminación plasmática que se desvía de una proteína de tipo silvestre en no más de un 10 %, tal como no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 5 %, no más de un 3 %, no más de un 1 % y no más de un 0 %.

La proteína puede tener una tasa de eliminación plasmática (ml/día/kg) que se desvía de una proteína de tipo silvestre en no más de un 10 %, tal como no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 5 %, no más de un 3 %, no más de un 1 % y no más de un 0 % donde la tasa de eliminación plasmática se calcula por la dosis (μg/kg) administrada a un sujeto dividida por el área bajo la curva (ABC), donde el valor del ABC se determina a partir de las curvas de concentración-tiempo.

La proteína puede tener una tasa de eliminación plasmática que se desvía de una proteína de tipo silvestre en no más de un 10 %, tal como no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 5 %, no más de un 3 %, no más de un 1 %, y no más de un 0 % cuando la tasa de eliminación plasmática (ml/día/kg) se calcula en función de la absorbancia a 405 nm medida en un ensayo ELISA cuantitativo donde las muestras de prueba son muestras de sangre, tales como suero sanguíneo.

La expresión "ELISA cuantitativo", como se usa en el presente documento, se refiere a un ELISA que permite evaluar si una determinada proteína está presente o ausente dentro de una muestra y al mismo tiempo proporciona un valor de concentración para la proteína dentro de la muestra. Para llevar a cabo ELISA cuantitativo, se debe generar una curva estándar precisa para determinar concentraciones de proteína en las muestras. Una curva estándar es normalmente una dilución en serie de una disolución de concentración conocida de la molécula diana. Por lo tanto, en ELISA cuantitativo, la densidad óptica (DO) de la muestra se compara con la curva estándar.

La proteína puede tener una tasa de eliminación plasmática que se desvía de una proteína de tipo silvestre en no más de un 10 %, tal como no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 5 %, no más de un 3 %, no más de un 1 %, y no más de un 0 % cuando la tasa de eliminación plasmática (ml/día/kg) se calcula en función de la absorbancia a 405 nm medida en un ensayo ELISA cuantitativo que comprende las etapas de (i) un anticuerpo de captura, tal como el anticuerpo anti-IgG-kappa humana, (ii) un anticuerpo de detección que reconoce la proteína, tal como el anticuerpo anti-IgG-HRP humana.

La expresión "anticuerpo de captura", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo no marcado que está recubierto con la placa ELISA. El anticuerpo de captura se usa para detectar/capturar la proteína de interés de una muestra a medir.

La expresión "anticuerpo de detección", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo marcado que se usa para detectar la proteína de interés, que está unida al anticuerpo de captura. El marcador consiste en una enzima que puede catalizar la conversión de un sustrato cromogénico en productos coloreados. El producto coloreado se puede cuantificar mediante la medición de una DO específica, normalmente alrededor de 405 nm dependiendo del sustrato cromogénico.

La proteína puede tener una tasa de eliminación plasmática que se desvía de una proteína de tipo silvestre en no más de un 10 %, tal como no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 5 %, no más de un 3 %, no más de un 1 %, y no más de un 0 % cuando la tasa de eliminación plasmática (ml/día/kg) se calcula en función de la absorbancia a 405 nm medida en un ensayo ELISA que comprende las etapas de (i) recubrir una placa ELISA con anticuerpo de ratón anti-IgG-kappa humana, (ii) bloquear con 0,2 % de BSA/PBS, (iii) incubar con diluciones de muestras de sangre, (iv) lavar las placas, (v) incubar con anticuerpo de cabra anti-IgG-HRP humana, (vi) desarrollar las placas con 1 mg/ml de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y (vii) añadir 100 µl de ácido oxálico al 2 % para detener la reacción.

La expresión "tasa de eliminación plasmática", como se usa en el presente documento, se refiere a una medida cuantitativa de la tasa a la que se elimina una proteína de la sangre tras la administración a un organismo vivo. La evaluación de la eliminación plasmática de los anticuerpos puede evaluarse en ratones SCID, como se describe en el Ejemplo 9. Por lo tanto, la tasa de eliminación plasmática puede medirse mediante un ensayo que comprende las etapas de inyectar ratones SCID C.B-17 de 7-10 semanas de edad (CB17/lcr-Prkdcscid/lcrIcoCrl, Charles-River) con una sola dosis i.v. de 100 µg (5 mg/kg) de anticuerpo, tomar muestras de sangre con intervalos de tiempo regulares, recolectar sangre en viales que contienen heparina, centrifugar durante 5 minutos a 10.000 xg, recubrir placas ELISA de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con anticuerpo de ratón anti-IgG-kappa humana en PBS, lavar las placas, bloquear con 0,2% de BSA/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, incubar con diluciones (1/50 a 1/2400 en 0,2% de BSA/PBST) de las muestras de sangre o una curva estándar durante 1 hora a temperatura ambiente, lavar las placas con PBST, incubar con un anticuerpo de cabra anti-IgG-HRP humana durante 1 hora a temperatura ambiente, desarrollar durante aproximadamente 30 minutos con 1 mg/ml de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), añadir 100 µl de ácido oxálico al 2 % parando así la reacción, medir la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas adecuado, cuantificar el anticuerpo, representar la concentración plasmática del anticuerpo (µg/ml) a lo largo del tiempo (días) en un gráfico y calcular la tasa de eliminación plasmática (ml/día/kg).

La tasa de eliminación plasmática (ml/día/kg) puede calcularse en función del área bajo la curva (ABC) de acuerdo con la siguiente ecuación;

$$\text{Eliminación plasmática} = \frac{\text{Dosis } (\mu\text{g/kg})}{\text{ABC } (\mu\text{g/ml/día})}$$

donde el valor del ABC se determina a partir de las curvas de concentración-tiempo.

La expresión "se desvía", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a la tasa de eliminación plasmática, se refiere a una diferencia en la medida cuantitativa de la tasa de eliminación de la proteína de la sangre tras la administración a un organismo vivo en comparación con la tasa de eliminación plasmática de una proteína de tipo silvestre. Por lo tanto, la desviación o diferencia se puede dar como una diferencia porcentual.

La expresión "tipo silvestre", como se usa en el presente documento, en relación con la comparación de una proteína de la presente invención, se refiere a una proteína que es idéntica a la proteína de la presente invención con la que se está comparando a excepción de las opciones de los tres aminoácidos de acuerdo con la presente

invención. La proteína de tipo silvestre comprende los aminoácidos de origen natural de las cadenas polipeptídicas en las posiciones de aminoácidos de las tres modificaciones de la presente invención, es decir, una proteína que no comprende las modificaciones de aminoácidos de acuerdo con la invención. Específicamente, un anticuerpo de tipo silvestre en relación con la invención comprende una leucina en las posiciones 234 y 235, y un ácido aspártico en la posición 265 cuando el anticuerpo es un anticuerpo de IgG1. Por lo tanto, una proteína de tipo silvestre, tal como un anticuerpo, seguirá siendo una proteína activadora, que es capaz de unirse, por ejemplo, a receptores Fcγ. Una proteína de tipo silvestre y una proteína de acuerdo con la invención pueden comprender otras modificaciones de aminoácidos que las de la invención, por ejemplo, para hacer que la proteína sea biespecífica o similar. Por lo tanto, "tipo silvestre" se refiere específicamente a los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y 265 en una cadena pesada de IgG1 humana, donde los aminoácidos no han sido sustituidos por ningún otro aminoácido que los aminoácidos de origen natural en dichas posiciones.

El término "ELISA", como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo de inmunosorción ligado a enzimas que es una prueba que usa anticuerpos y cambio de color para identificar una sustancia. Un primer anticuerpo específico se une a la superficie de la placa. De este modo, se añade la proteína de una muestra donde se prueba la unión a dicho primer anticuerpo específico. Se añade un segundo anticuerpo que une la proteína de la muestra. El segundo anticuerpo está unido a una enzima y, en la etapa 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 la proteína de acuerdo con la invención. Por lo tanto, esta interpretación no debe entenderse como limitante, ya que se pueden realizar diversas formas de ELISA, tal como se describe en los Ejemplos 4 o 5.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" es normalmente un ser humano que responde a la proteína de la invención.

Como se puede observar en el Ejemplo 9, el anticuerpo que comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes a L234, L235 y D265, respectivamente, en una cadena pesada de IgG1 humana, mostró una tasa de eliminación plasmática comparable a la del anticuerpo de tipo silvestre que no se esperaba. Otro anticuerpo probado que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y N297Q, que mostró resultados comparables al probar la activación de linfocitos T, proliferación celular, destrucción inespecífica, liberación de citocinas y C1q, no tuvo una tasa de eliminación plasmática comparable a la del anticuerpo de tipo silvestre. Lo mismo se observó para un anticuerpo que comprende solo la sustitución de aminoácidos L234F y L235E, un anticuerpo que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E, D265A, N297Q y P331S, y un anticuerpo que comprende las sustituciones de aminoácidos D265A y N297Q.

El primer y segundo polipéptido pueden ser una primera y una segunda cadena pesada de una inmunoglobulina, respectivamente.

En los casos donde la proteína es un anticuerpo, el primer y el segundo polipéptidos pueden tener el mismo propósito y significado que una primera y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo. Por lo tanto, el primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden entenderse como la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada, respectivamente, del anticuerpo.

El primer y segundo polipéptido pueden comprender además una primera y una segunda región de unión, respectivamente.

La expresión "región de unión", como se usa en el presente documento, se refiere a una región de una proteína que es capaz de unirse a cualquier molécula, tal como un polipéptido, por ejemplo, presente en una célula, bacteria o virión. La región de unión puede ser una secuencia polipeptídica, tal como una proteína, ligando de proteína, receptor, una región de unión a antígeno o una región de unión a ligando capaz de unirse a una célula, bacteria o virión. Específicamente, la región de unión es una región de unión a antígeno. Si la región de unión es, por ejemplo, un receptor, la proteína puede haberse preparado como una proteína de fusión de un dominio Fc de una inmunoglobulina y dicho receptor. Si la región de unión es una región de unión a antígeno, la proteína puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un anticuerpo solo de cadena pesada o una fusión ScFv-Fc.

El término "unión", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de una proteína a un antígeno o diana predeterminada, tal como un receptor, al que se une normalmente con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, por ejemplo, 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, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, de sus siglas en inglés) en un instrumento BIAcore 3000 que utiliza el antígeno como ligando y la proteína 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 1000 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 antígeno no específico (por

ejemplo, BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D de la proteína, de modo que cuando la K_D de la proteína es muy baja (es decir, la proteína es altamente específica), entonces la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10.000 veces. El término " K_D " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

El término " K_D " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

El término " K_A " (M^{-1}), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular y se obtiene mediante la división de la k_a por la k_d .

El término " k_d " (segundos $^{-1}$), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se conoce como el valor k_{off} .

El término " k_a " ($M^{-1} \times \text{segundo}^{-1}$), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

La proteína puede comprender además una primera y una segunda cadena ligera de una inmunoglobulina, donde dicha primera cadena ligera está conectada con dicha primera cadena pesada a través de puentes disulfuro y dicha segunda cadena ligera está conectada con dicha segunda cadena pesada a través de puentes disulfuro, formando así una primera región de unión y una segunda región de unión, respectivamente.

La expresión "puentes disulfuro", como se usa en el presente documento, se refiere al enlace covalente entre dos restos de cisteína, es decir, dicha interacción también puede designarse como una interacción Cys-Cys.

La proteína, de acuerdo con la presente invención, puede ser monoespecífica, que en el contexto de la presente invención se refiere a una proteína que se une al mismo epítipo con sus regiones de unión. Sin embargo, la invención no se limita a proteínas monoespecíficas, sino que también se refiere a proteínas multiespecíficas, tales como proteínas biespecíficas. Por lo tanto, al menos una de la primera o segunda región de unión puede unirse a CD3. Dicha primera región de unión puede unirse a CD3 y dicha segunda región de unión se une a cualquier otra diana de interés. Dicha otra diana puede ser una diana específica de tumor o una diana específica de cáncer.

La expresión "CD3 humano", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 3 humano que forma parte del complejo de proteína correceptor de linfocitos T y está compuesto por cuatro cadenas distintas. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ (gamma) (cadena CD3 γ humana de 182 aminoácidos, Swissprot P09693 y Cd3 γ de macaco cangrejero de 181 aminoácidos, Swissprot Q95L17), una cadena CD3 δ (delta) (171 aminoácidos, CD3 δ humana, Swissprot P04234 SEQ ID NO: 14 y CD3 δ de macaco cangrejero Swissprot Q95L18), dos cadenas CD3 ϵ (épsilon) (CD3 ϵ humana de 207 aminoácidos, Swissprot P07766, CD3 épsilon humana madura SEQ ID NO: 13; CD3 ϵ de macaco cangrejero de 198 aminoácidos, Swissprot Q95LI5, CD3 épsilon madura de macaco cangrejero SEQ ID NO: 21), y una cadena de cadena CD3 ζ (zeta) (CD3 ζ humana de 164 aminoácidos, Swissprot P20963, CD3 ζ de macaco cangrejero de 166 aminoácidos, Swissprot Q09TK0). Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como receptor de linfocitos T (TCR, de sus siglas en inglés) y generan una señal de activación en los linfocitos T. Las moléculas TCR y CD3 juntas comprenden el complejo TCR.

Al menos una de dichas primera y segunda región de unión puede unirse a la cadena épsilon de CD3, tal como la cadena de épsilon de CD3 humano (SEQ ID NO: 14). Al menos una de dichas primera y segunda región de unión puede unirse a un epítipo dentro de los aminoácidos 1-27 de la parte N-terminal de CD3 ϵ (épsilon) humana madura (aminoácido 1-27 de CD3 épsilon humano maduro como se establece en la SEQ ID NO: 14). La proteína puede incluso reaccionar de forma cruzada con otras especies de primates no humanos, tales como los macacos cangrejeros (CD3 épsilon madura de macaco cangrejero como se establece en la SEQ ID NO: 21) y los macacos de la India.

El término "maduro", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que no comprende ninguna secuencia señal o líder. Es bien sabido por la persona experta determinar una proteína madura, o cómo identificar la secuencia de la proteína madura.

Los aminoácidos en posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana de al menos dicho primer polipéptido pueden no ser L, L y D, respectivamente, y donde dicha primera región de unión se une a CD3.

Tanto la primera como la segunda región de unión puede unirse a CD3.

Los presentes inventores han evaluado la unión al receptor Fc γ , la unión a Fc del complemento y otros factores adicionales que son relevantes para evaluar la inercia química de una proteína, tal como un anticuerpo. En el caso

de anticuerpos anti-CD3, uno de dichos factores adicionales es el nivel de expresión del marcador de activación de linfocitos T CD69, que es la glucoproteína de superficie celular inducible más temprana requerida durante la activación linfoide.

5 Por lo tanto, en una realización, la proteína de la invención, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, puede mediar la activación reducida de linfocitos T mediada por Fc en comparación con una proteína de tipo silvestre en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 %, cuando la activación de linfocitos T se determina mediante la expresión de CD69. La expresión "cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3" se refiere a dichas características de la proteína que se observan cuando la proteína se prueba en dicho ensayo como un anticuerpo monoespecífico. Sin embargo, no debe entenderse que se limita la proteína de la presente invención a un anticuerpo monoespecífico que se une a un CD3, ya que una proteína de la presente invención que comprende dichas características puede usarse en otros formatos como se describe en el presente documento, tal como en un anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

15 La proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, puede mediar la expresión reducida de CD69 mediada por Fc en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 % cuando se compara con una proteína de tipo silvestre, cuando la expresión de CD69 se determina en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés).

25 La proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, puede mediar la activación reducida de linfocitos T mediada por Fc en comparación con una proteína de tipo silvestre en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 %, cuando la activación de linfocitos T se determina mediante la expresión de CD69 en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

30 La proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, puede mediar la expresión reducida de CD69 cuando se compara con una proteína de tipo silvestre en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 %, cuando la expresión de CD69 se mide en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que comprende las etapas de (i) incubar PBMC con un anticuerpo a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol) durante aproximadamente 16-24 horas, (ii) lavar las células, (iii) teñir las células a 4 °C con un anticuerpo de ratón anti-CD28-PE humano y un anticuerpo de ratón anti-CD69-APC humano, y (iv) determinar la expresión de CD69 en células CD28 positivas mediante citometría de flujo.

40 El término "reducido", como se usa en el presente documento, cuando se refiere al nivel de expresión del marcador de activación de linfocitos T CD69, se refiere a una reducción en el nivel de expresión de CD69 cuando se compara con el nivel de expresión de CD69 cuando el linfocitos T está unido por un tipo silvestre proteína siempre que ambas regiones de unión de la proteína se unan a CD3. La capacidad de una proteína para reducir la expresión de CD69 puede evaluarse mediante un ensayo funcional basado en PBMC, como se describe en el Ejemplo 3. Por lo tanto, la expresión de CD69 se puede medir mediante un método que comprende las etapas de incubar PBMC con un anticuerpo en el intervalo de 1-1000 ng/ml a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol) durante 16-24 horas, lavar las células, teñir las células a 4 °C con un anticuerpo de ratón anti-CD28-PE humano y un anticuerpo de ratón anti-CD69-APC humano, y determinar la expresión de CD69 en células CD28 positivas mediante citometría de flujo.

50 El término "CD69", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo de diferenciación 69 que es una proteína de lectina transmembrana de tipo C humana codificada por el gen *CD69*. La activación de linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales (NK), tanto *in vivo* como *in vitro*, induce la expresión de CD69. CD69 funciona como un receptor de transmisión de señales implicado en acontecimientos de activación celular, que incluye la proliferación, funciona como un receptor de transmisión de señales en linfocitos, que incluye linfocitos citolíticos naturales y plaquetas, y la inducción de genes específicos.

55 La expresión "ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)", como se usa en el presente documento, se refiere a un ensayo usado para evaluar una característica funcional de la proteína de la presente invención, tal como la capacidad de dicha proteína para afectar la proliferación de linfocitos T o expresión de CD69, donde las únicas células presentes son células mononucleares de sangre periférica. Un ensayo funcional basado en PBMC como se describe en el Ejemplo 3 comprende las etapas de (i) incubar PBMC con un anticuerpo a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol) durante aproximadamente 16-24 horas, (ii) lavar las células, (iii) teñir las células a 4 °C con un anticuerpo de ratón anti-CD28-PE humano y un anticuerpo de ratón anti-CD69-APC humano, y (iv) determinar la expresión de CD69 en células CD28 positivas mediante citometría de flujo, cuando se evalúa la expresión de CD69.

65 La capacidad de los anticuerpos anti-CD3 para inducir la activación de linfocitos T, o los anticuerpos potencialmente agonistas que pueden activar linfocitos T después de la unión y la reticulación, depende de sus capacidades de

unión a FcR. Una proteína que no da como resultado la expresión de CD69 en linfocitos T indica que la proteína no permite la unión al receptor Fcγ. La expresión "receptor Fcγ", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de receptores de Fc que pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas y son los receptores de 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.

Los presentes inventores han demostrado que se observa expresión baja o no se observa expresión de CD69 cuando un anticuerpo monoespecífico que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A se une al linfocito T (véanse los Ejemplos 3 y 11). Por lo tanto, el nivel de expresión del marcador de activación de linfocitos T CD69 puede reducirse completamente.

La expresión "activación de linfocitos T mediada por Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier activación de los linfocitos T que está mediada por la unión de una región Fc de anticuerpo a FcR en células que llevan FcR. La región Fc se refiere a una región de la proteína que comprende, en la dirección desde el extremo N al C, al menos una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Una región Fc de un anticuerpo de IgG1 puede, por ejemplo, generarse mediante digestión de un anticuerpo de IgG1 con papaína.

El término "hrs.", como se usa en el presente documento, se refiere a la abreviatura de "horas".

La proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, puede mediar la proliferación reducida de linfocitos T mediada por Fc en comparación con una proteína de tipo silvestre en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 %, cuando la proliferación de linfocitos T se mide en un ensayo funcional basado en PBMC.

La proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, puede mediar la proliferación reducida de linfocitos T mediada por Fc en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 %, cuando la proliferación de linfocitos T se mide en un ensayo funcional basado en PBMC que comprende las etapas de (i) incubar PBMC con un anticuerpo a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol) durante tres días, (ii) añadir un agente capaz de incorporarse al ADN celular, (iii) incubar durante 3 a 8 horas, (iv) sedimentar las células, (v) recubrir las células de una placa ELISA, (vi) incubar con un agente incorporado anti-ADN durante 60 a 120 minutos a temperatura ambiente.

La proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, puede mediar la proliferación reducida de linfocitos T mediada por Fc en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 %, cuando la proliferación de linfocitos T se mide en un ensayo funcional basado en PBMC que comprende las etapas de (i) incubar PBMC con un anticuerpo a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol) durante tres días, (ii) añadir BrdU, (iii) incubar durante cinco horas, (iv) sedimentar las células, (v) recubrir las células de una placa ELISA, (vi) incubar con anti-BrdU-peroxidasa durante 90 minutos a temperatura ambiente, (vii) desarrollar la placa durante aproximadamente 30 minutos con 1 mg/ml de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), (viii) añadir 100 µl de ácido oxálico al 2 % para detener la reacción, y (xi) medir la absorbancia a 405 nm.

El término "reducido", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a la proliferación de linfocitos T, se refiere a una reducción en la capacidad de una proteína para inducir la proliferación de linfocitos T en comparación con la inducción de la proliferación de linfocitos T unidas por una proteína de tipo silvestre siempre que ambas regiones de unión de la proteína se unan a CD3. La reducción en la capacidad de una proteína para inducir la proliferación de linfocitos T puede evaluarse mediante un ensayo funcional basado en PBMC, como se describe en el Ejemplo 4. Por lo tanto, la proliferación de linfocitos T se puede medir mediante un método que comprende las etapas de incubar PBMC con un anticuerpo en el intervalo de 1-1000 ng/ml a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol) durante tres días, añadir un compuesto químico, tal como BrdU, que se incorpora al ADN de las células en proliferación, incubar durante cinco horas, sedimentar las células, secar las células, opcionalmente almacenar las células a 4 °C, recubrir las células de la placa ELISA, incubar con anti-BrdU-peroxidasa durante 90 minutos a temperatura ambiente, desarrollar durante aproximadamente 30 minutos con 1 mg/ml de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), añadir 100 µl de ácido oxálico al 2 % para detener la reacción, y medir la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas adecuado.

El término "BrdU", como se usa en el presente documento, se refiere a 5-bromo-2'-desoxiuridina, que es un homólogo de la timidina. Cuando se añade BrdU al cultivo celular durante un período de tiempo limitado (por ejemplo, 4 horas), se incorporará al ADN de las células en proliferación. Después de fijar las células, la detección de BrdU incorporada puede realizarse en un ELISA usando anti-BrdU-peroxidasa. La incorporación de BrdU es, por lo tanto, una medida para la proliferación.

La proliferación de linfocitos T puede reducirse por completo. Por lo tanto, no puede observarse proliferación de linfocitos T, o el nivel de proliferación puede ser igual a la proliferación de linfocitos T que no han sido tratados con

una proteína de acuerdo con la invención o han sido tratados con una proteína de tipo silvestre. Un anticuerpo que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A puede dar como resultado absolutamente ninguna proliferación de linfocitos T, lo que indica que el anticuerpo no permite la unión al receptor Fc γ , como se describe en los Ejemplos 4 y 12.

5 Además, se ha demostrado que un anticuerpo de acuerdo con la invención, es decir, un anticuerpo que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A, conserva su capacidad para destruir células tumorales. Como se puede observar en el Ejemplo 5, las sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la presente invención tienen poco efecto sobre la eficacia de los anticuerpos. La prueba de una proteína de acuerdo con la presente
10 invención para la eficacia de citotoxicidad, se puede realizar en un ensayo de citotoxicidad que comprende las etapas de (i) colocar células tumorales en una placa celular, (ii) añadir muestras, tales como diluciones de anticuerpos, en una serie de respuesta a la dosis, (iii) incubar la placa celular durante aproximadamente 3 horas, (iv) añadir PBCM aisladas de sangre completa, (v) incubar las placas durante tres días, (vi) lavar las placas, (vii) incubar las placas con medio de cultivo que contiene azul de Alamar al 10 % durante cuatro horas, y (viii) medir la viabilidad
15 celular.

Un anticuerpo mono-específico que cumpla las condiciones de ensayo descritas en el presente documento puede formar la base de un anticuerpo bio-específico, es decir, en un anticuerpo bio-específico donde una de las regiones de unión se une a CD3 puede originarse a partir de cualquier anticuerpo mono-específico de CD3 probado para la
20 capacidad de mediar la expresión reducida de CD69 y/o la proliferación de linfocitos T mediada por Fc en los ensayos funcionales y que cumpla los requisitos, descritos en el presente documento.

Los presentes inventores han demostrado, que un anticuerpo bio-específico que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A, y que la primera región de unión se une a CD3 y que la segunda región de
25 unión se une a un antígeno específico de cáncer (HER2), que además de la capacidad de inducir la destrucción dependiente de la dosis de células AU365 con al menos una eficacia comparable en comparación con el anticuerpo bio-específico de tipo silvestre sin la mutación no activadora (como se describe en los Ejemplos 5 y 13), un anticuerpo bio-específico de acuerdo con la invención también mostró que inhibe la liberación de citocinas causada por la destrucción inespecífica, como se describe en el Ejemplo 6. Se demostró que la incubación de las células diana y efectoras en presencia de un anticuerpo bio-específico de acuerdo con la invención, no condujo a ninguna producción
30 de citocinas causada por la destrucción inespecífica (como se describe en el Ejemplo 5), mientras que el anticuerpo de tipo silvestre mostró un mayor producción de citocinas, que se cree que se debe a la activación inespecífica de linfocitos T mediante reticulación con otras células efectoras. En el presente documento también se divulga una proteína en la que el primer y segundo polipéptido de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a la posición L234, L235 y D265, en una cadena pesada de IgG1 humana no son L, L y D, dicha primera región de unión se une a CD3 y dicha segunda región de unión se une a una diana específica de tumor.

La expresión "liberación de citocinas", como se usa en el presente documento, se refiere a la liberación de citocinas, tales como interleucinas e interferones, tras la activación de, por ejemplo, linfocitos T. Las citocinas están implicadas
40 en una amplia gama de actividades biológicas que incluyen inmunidad innata, inmunidad adaptativa e inflamación. Las citocinas pueden activar los tipos de células de las que se han liberado y, por lo tanto, estimulan la producción de más citocinas.

La capacidad de una proteína de acuerdo con la invención para inducir la liberación de citocinas puede determinarse en un ensayo que comprende las etapas de (i) incubar el sobrenadante de un ensayo de citotoxicidad como se describió anteriormente durante aproximadamente 1 a 2 horas a temperatura ambiente en una placa, (ii) incubar
45 adicionalmente de 1 a 2 hrs. con una solución añadida que comprende anticuerpos contra las citocinas que se van a analizar, pudiendo ser dicha solución una solución de detección de anticuerpos para la placa, (iii) lavar la placa, (iv) añadir un conductor para mejorar la señal a leer, tal como un tampón de lectura T, y (v) medir la quimioluminiscencia.
50

Como se ha descrito anteriormente, la activación del complemento es una función efectora que algunos anticuerpos son capaces de inducir. La primera etapa en la cascada del complemento es la unión a Fc de C1q y, por lo tanto, sirve como un indicador de la capacidad de CDC de los anticuerpos. Como la presente invención se refiere a la
55 inercia química de anticuerpos, no se desea la activación del complemento y, por lo tanto, el depósito de C1q en los anticuerpos se determinó mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 7. Como se determinó en dicho Ejemplo, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención anula la unión de C1q, lo que sugiere que los anticuerpos de la presente invención no son capaces de inducir CDC.

La expresión "unión de C1q", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la unión de C1q a un anticuerpo, cuando dicho anticuerpo se une a su antígeno. La expresión "unido a su antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere tanto a la unión de un anticuerpo a su antígeno *in vivo* como *in vitro*.

Por lo tanto, la capacidad de una proteína, de acuerdo con la presente invención, de unión de C1q se puede
65 determinar mediante ELISA que comprende las etapas de añadir un anti-C1q humano y añadir un anticuerpo anti-IgG-Fc-HRP de conejo.

Específicamente, la capacidad de una proteína, de acuerdo con la presente invención, de unión de C1q se puede determinar mediante ELISA que comprende las etapas de (i) recubrir una placa ELISA con una serie de diluciones de una proteína, (ii) bloquear la placa, (iii) añadir suero al 3 %, (iv) incubar la placa durante 1 hora a 37 °C, (v) lavar la placa, (vi) añadir un anti-C1q humano, (vii) incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, (viii) lavar la placa, (ix) añadir anticuerpo anti-IgG-Fc-HRP de conejo, (x) incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, (xi) lavar la placa, (xii) desarrollar la placa y (xiii) medir la DO₄₀₅ nm.

El análisis adicional de una proteína de acuerdo con la presente invención puede incluir determinar la unión a FcγRI como se describe en el Ejemplo 8. Como se ha descrito anteriormente, los receptores Fcγ son un grupo de receptores Fc, que comprenden cinco variantes diferentes de receptores Fcγ. FcγRI es un receptor Fc de alta afinidad, lo que significa que la unión entre un FcγRI y una región Fc de una proteína es fuerte. Si la unión al FcγRI se puede inhibir o incluso anular, es un buen indicador de la inercia química de una proteína. Por lo tanto, evaluar la unión de Fc de una proteína a FcγRI, es otra forma de determinar la inercia química de dicha proteína. En una realización, la proteína de acuerdo con la presente invención ha anulado completamente la unión de Fc a FcγRI. La capacidad de unión a FcγRI de una proteína de acuerdo con la presente invención puede evaluarse mediante citometría de flujo que comprende las etapas de (i) incubar células positivas para FcγRI durante aprox. 30 minutos a 4 °C con un anticuerpo a analizar; (ii) lavar las células, (iii) teñir las células durante aprox. 30 minutos a 4 °C con un anticuerpo anti-IgG-PE F(ab')₂ humano, (iv) lavar las células y (v) medir la fluorescencia media de las células.

El término "aprox.", como se usa en el presente documento, se refiere a una abreviatura del término "aproximadamente".

Como se describe en el presente documento, un anticuerpo de acuerdo con la invención, donde dicho primer y segundo polipéptido de dicho anticuerpo comprenden las sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A, y la primera región de unión se une a CD3, se ha demostrado que reduce completamente la expresión de CD69 y, por lo tanto, anula la activación de linfocitos T (Ejemplo 3), reduce completamente la proliferación de linfocitos T (Ejemplo 4), reduce completamente la destrucción inespecífica (Ejemplo 5), reduce completamente la liberación de citocinas cuando está presente como un anticuerpo mono-específico de CD3 de unión, es decir, las dos regiones de unión del anticuerpo se unen a la misma diana (Ejemplo 6), anula la unión a C1q (Ejemplo 7) así como reduce completamente la unión a FcγRI (Ejemplo 8) en comparación con un anticuerpo de tipo silvestre. Por lo tanto, se cree que las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son posiciones cruciales en un anticuerpo para proporcionar un anticuerpo que tenga las características mencionadas anteriormente.

También se divulga en el presente documento una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos, 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 el presente documento también se divulga una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos 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 usa en el presente documento, en relación con un resto de aminoácido, se refiere a un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y. También se divulga en el presente documento una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos, 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 que consiste en; A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W e Y.

El término "polar", como se usa en el presente documento, en relación con restos de aminoácidos, se refiere a cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en; C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T. También se divulga en el presente documento una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona 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.

También se divulga en el presente documento una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos, 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 una 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 el presente documento también se divulga una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo polipéptido, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son aminoácidos hidrófobos o polares.

5 También se divulga en el presente documento una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo polipéptido, 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 que consiste en; A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W e Y.

15 También se divulga en el presente documento una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo polipéptido, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona 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.

20 También se divulga en el presente documento una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo polipéptido, 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 una 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.

25 En el presente documento también se divulga una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos 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.

30 La expresión "alifático sin carga", como se usa en el presente documento, en relación con restos de aminoácidos, se refiere a cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, I, L y V. También se divulga en el presente documento una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos, 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.

35 El término "aromático", como se usa en el presente documento, en relación con restos de aminoácidos, se refiere a cualquier resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: F, T y W. En el presente documento también se divulga una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos 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.

40 El término "ácido", como se usa en el presente documento, en relación con restos de aminoácidos, se refiere a cualquier resto de aminoácido elegido del grupo que consiste en: D y E. En el presente documento también se divulga una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos 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.

50 También se divulga en el presente documento una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos, 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.

55 En el presente documento también se divulga una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo polipéptido, 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.

60 También se divulga en el presente documento una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo polipéptido, 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.

65 En el presente documento también se divulga una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo polipéptido, 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.

También se divulga en el presente documento una proteína en la que tanto en dicho primer como segundo

polipéptido, 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.

5 En el presente documento también se divulga una proteína en la que al menos uno de dichos primer y segundo polipéptidos, los aminoácidos 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.

10 En una proteína de acuerdo con la presente invención, tanto en dicho primer como segundo polipéptido, los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente.

15 El término "isotipo", como se usa en el presente documento, se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) o cualquiera de sus alotipos tales como IgG1m(za) e IgG1m(f) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada. Además, cada isotipo de cadena pesada se puede combinar con una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ), o con cualquier alotipo de las mismas.

20 Por lo tanto, el isotipo de las cadenas pesadas de inmunoglobulina puede seleccionarse 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, tal como IgG1m(f) (SEQ ID NO: 13). Por lo tanto, el isotipo de las cadenas pesadas de inmunoglobulina puede ser una IgG1, o cualquier alotipo de la misma, tal como IgG1m(f).

Al menos dicha primera región de unión puede seleccionarse del grupo que consiste en;

25 a. una región de unión que comprende la secuencia de región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 12;
 b. una región de unión que comprende la secuencia de región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 8 y la secuencia de región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 12; y
 30 c. una región de unión que comprende la secuencia de región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 10.

Tanto dicho primer como segundo polipéptido pueden ser como se describieron anteriormente.

35 La segunda región de unión puede unirse a una diana diferente que dicha primera región de unión. Por lo tanto, la proteína es una proteína biespecífica, tal como un anticuerpo biespecífico. La expresión "proteína biespecífica" o "anticuerpo biespecífico" se refiere a una proteína o anticuerpo que tiene especificidades para dos epítomos diferentes, normalmente no superpuestos, y comprende dos regiones de unión diferentes. Dichos epítomos pueden estar en la misma diana o en dianas diferentes. Si los epítomos están en dianas diferentes, dichas dianas pueden estar en la misma célula o en diferentes células o tipos de células.

40 El término "diana", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula a la que se une la región de unión de la proteína de acuerdo con la invención. Cuando se usa en el contexto de la unión de un anticuerpo, incluye cualquier antígeno hacia el cual se dirige el anticuerpo presentado.

45 Por lo tanto, la proteína puede ser un anticuerpo biespecífico.

50 Existe una variedad de aplicaciones, tales como la inhibición del receptor o el reclutamiento de linfocitos T por anticuerpos biespecíficos, en las que la unión a Fc de la región Fc de anticuerpos terapéuticos a las células efectoras o al complemento no es necesaria o incluso no es deseable, ya que puede contribuir a una citotoxicidad no deseada. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico que se une con una región de unión al CD3 humano será capaz de reclutar linfocitos T citotóxicos. Los anticuerpos biespecíficos de CD3 con una región Fc activadora de IgG pueden inducir agonismo no deseado en ausencia de células tumorales a través de la reticulación por células que expresan Fc γ R, activación inadecuada de células que expresan Fc γ R y posterior tormenta de citocinas y efectos tóxicos asociados, o agregación plaquetaria. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos de CD3 con una región Fc no activadora son ventajosos para evitar la posible activación celular no deseada.

55 Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención no está limitado a ningún formato o método biespecífico particular para producirlo.

60 Ejemplos de moléculas de anticuerpos biespecíficos que pueden usarse en la presente invención comprenden (i) un único anticuerpo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión a antígeno, (ii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para dos epítomos diferentes, por ejemplo, a través de dos scFv unidos en tándem mediante un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig, de sus siglas en inglés), donde cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, en: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) un fragmento biespecífico (Fab')₂

- unido 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, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (vii) una denominada molécula de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la proteína cinasa A, que, cuando se aplica a Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (viii) una denominada molécula Scorpion, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.
- 5
- 10 En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un cuerpo cruzado o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio de brazo Fab controlado (tal como se describe en el documento WO 11/131746).
- Ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero sin limitación, (i) moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas de doble diana similares a IgG recombinantes, 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, donde los anticuerpos de IgG de longitud completa se fusionan con un fragmento Fab adicional o partes del fragmento Fab; (iv) moléculas de fusión de Fc, donde las moléculas de Fv de cadena sencilla o los cuerpos estabilizados se fusionan con dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos; (v) moléculas de fusión de Fab, 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 basados en diacuerpo y ScFv (por ejemplo, anticuerpos de dominio, nanocuerpos) donde diferentes moléculas de Fv de cadena única o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (por ejemplo, anticuerpos de dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o a otra proteína o molécula transportadora fusionada a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de los mismos.
- 15
- 20
- 25
- Ejemplos de moléculas similares a IgG con dominios complementarios CH3 incluyen, pero sin limitación, Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, documento WO2011069104), Knobs-into-Holes (Genentech, documento WO9850431), CrossMAbs (Roche, documento WO201117329) y los electrostáticamente emparejados (Amgen, documentos EP1870459 y WO2009089004; Chugai, documento US201000155133; Oncomed, documento WO2010129304), el LUZ-Y (Genentech), LUZ-Y (Genentech), DIG-body y PIG-body (Pharmabaccine), el cuerpo de dominio genomanipulado por intercambio de cadenas (SEEDbody) (EMD Serono, documento WO2007110205), Biclomics (Merus), FcΔAdp (Regeneron, documento WO201015792), IgG1 e IgG2 biespecíficas (Pfizer/Rinat, documento WO11143545), armazón Azymetric (Zymeworks/Merck, documento WO2012058768), AcM-Fv (Xencor, documento WO2011028952), anticuerpos bivalentes biespecíficos (Roche) y DuoBody (Genmab A/S, documento WO2011131746).
- 30
- 35
- Ejemplos de moléculas de doble diana similares a IgG recombinantes incluyen, pero sin limitación, doble diana(DD) - Ig (GSK/Domantis), anticuerpo dos en uno (Genentech), AcM reticulados (Karmanos Cancer Center), AcM² (F-Star, documento WO2008003116), Zybodies (Zyngenia), enfoques con cadena ligera común (Crucell/Merus, documento US 7.262.028), κcuerpos (NovImmune) y CovX-body (CovX/Pfizer).
- 40
- Ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, pero sin limitación, dominio variable doble (DVD)-Ig (Abbott, documento US 7.612.181), Anticuerpos de doble cabeza de doble dominio (Unilever; Sanofi Aventis, documento WO20100226923), biespecífico similar a IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US007951918), fusión de scFv (Novartis), fusión de scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, documento CN 102250246) y TvAb (Roche, documentos WO2012025525, WO2012025530).
- 45
- Ejemplos de moléculas de fusión Fc incluyen, pero sin limitación, fusiones ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Tecnología de retardo de afinidad doble (Fc-DART) (MacroGenics, documento WO2008157379, documento WO2010/080538) y (ScFv)₂-Fab doble (National Research Center for Antibody Medicine - China).
- 50
- Ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión Fab incluyen, pero sin limitación, F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), DualAction o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalente Biespecífico (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Celltech).
- 55
- Ejemplos de anticuerpos ScFv, basados en diacuerpo y de dominio incluyen, pero sin limitación, captadores de linfocitos T biespecíficos (BiTE) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), Tecnología de retardo de afinidad doble (DART) (MacroGenics), Diacuerpo de cadena simple (Academic), Anticuerpos similares a TCR (AIT, ReceptorLogics), fusión de seroalbúmina humana ScFv (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech), nanocuerpos de doble orientación (Ablynx), anticuerpos de dominio de solo cadena pesada de doble orientación.
- 60
- Se contempla además que cualquier anticuerpo monoespecífico que cumpla las condiciones de ensayo descritas en el presente documento puede formar la base de un anticuerpo biespecífico, es decir, en un anticuerpo biespecífico donde una de las regiones de unión se une a CD3 puede originarse a partir de cualquier anticuerpo monoespecífico
- 65

de CD3 probado en los ensayos funcionales y cumplir los requisitos establecidos en el presente documento. Dicho anticuerpo biespecífico puede proporcionarse mediante los métodos descritos en el documento WO 2011/131746.

5 Por lo tanto, en dicho primer polipéptido, 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 puede haber sido sustituido, y en dicho segundo polipéptido, 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 se ha sustituido, y donde dichas sustituciones de dichos primer y segundo polipéptidos no están en las mismas posiciones. En este contexto, el término "sustituido", se refiere al aminoácido en una posición de aminoácido específica que ha sido sustituido con otro aminoácido de origen 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 las posiciones particulares es diferente del aminoácido de origen natural en una cadena pesada de IgG1.

15 En dicho primer polipéptido, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana puede no ser K, L o M, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es F, y en dicho segundo polipéptido, 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 se han sustituido.

20 En dicho primer polipéptido, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana puede no ser K, L o M, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es F, y en dicho segundo polipéptido, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K.

30 En dicho primer polipéptido, el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana puede no ser F, R y G, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K, y en dicho segundo polipéptido, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a una posición seleccionada forman el grupo que consiste en; T366, L368, K370, D399, Y407 e K409 en una cadena pesada de IgG1 humana se han sustituido.

35 En dicho primer polipéptido, el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana puede no ser K, L o M, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es F, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana no es F y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es K.

40 El aminoácido en la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana puede ser L en dicho primer polipéptido, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en dicho segundo polipéptido, o viceversa.

45 Las dianas pueden estar presentes en diferentes células. La primera región de unión puede unirse a CD3 presente en un linfocito T y la segunda región de unión se une a una diana específica de tumor presente en una célula cancerosa. Por lo tanto, la proteína biespecífica, tal como un anticuerpo biespecífico, se une a dos tipos de células diferentes. Cuando ambos tipos de células están comprometidos, la activación de los linfocitos T, particularmente de los linfocitos T citotóxicos (linfocitos T CD8+), se activará mediante la interacción específica entre los linfocitos T y las células cancerosas/tumorales. Por lo tanto, la proteína de acuerdo con la presente invención proporciona una forma atractiva de activar los linfocitos T y destruir células cancerosas.

50 Por lo tanto, la proteína puede ser un anticuerpo biespecífico, donde tanto en dicho primer como segundo polipéptido, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente, dicha primera región de unión se une a CD3 y dicha segunda región de unión se une a una diana específica cancerosa.

55 La proteína descrita en el presente documento puede ser un anticuerpo. La proteína puede ser un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de IgG1 humana.

60 Además, se contempla que una proteína de tipo silvestre descrita en el presente documento también puede ser una proteína precursora. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a una variante de dicha proteína precursora. Por lo tanto, se contempla que cualquier proteína también puede considerarse como una variante de una proteína precursora obtenida mediante la modificación de la proteína precursora.

65 La proteína, de acuerdo con la invención, se puede preparar mediante un método que comprende introducir en el primer y/o segundo polipéptido de una proteína de tipo silvestre, sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana.

Se puede preparar una variante mediante un método que comprende introducir en el primer y/o segundo polipéptido de una proteína precursora, sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana.

5 Los métodos para preparar un anticuerpo son bien conocidos por la persona experta. Sin embargo, un ejemplo no limitante de preparación de un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser mediante un método que comprende inmunizar un animal no humano, por ejemplo, un ratón, obtener los anticuerpos del animal no humano, introducir mutaciones de aminoácidos en la región Fc de acuerdo con la invención mediante técnicas recombinantes, expresar los ácidos nucleicos obtenidos mediante las técnicas recombinantes en un sistema de expresión adecuado, y purificar los anticuerpos expresados.

15 Como se describe en el presente documento, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo donde en al menos una de las dos cadenas pesadas de una inmunoglobulina 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. Por lo tanto, la proteína de la presente invención puede prepararse mediante la introducción de mutaciones en dichas posiciones de un anticuerpo. Un anticuerpo en el que se introducen dichas mutaciones puede considerarse como un "anticuerpo precursor". Los anticuerpos "precursores", que pueden ser anticuerpos de tipo silvestre, para usarse como material de partida antes de la modificación pueden, por ejemplo, producirse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos de fago utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature* 352, 624 628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581 597 (1991). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas procedentes de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o mamíferos no humanos tales como conejos, ratas, perros, primates, etc.

30 Los anticuerpos precursores pueden ser por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos, por ejemplo, ratones HuMAb, que transportan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. El ratón HuMAb contiene un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y cadena pesada (μ y γ) humana no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y γ (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856 859 (1994)). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de la IgM de ratón o κ , γ , en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgG, κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49 101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65 93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764 536 546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287 6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647 656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912 2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579 591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845 851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos pueden usarse para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

50 Además, los anticuerpos humanos de la presente invención o los anticuerpos de la presente invención de otras especies pueden identificarse a través de tecnologías de tipo de presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica, presentación en mamíferos, presentación en levaduras y otras técnicas conocidas en la técnica, y las moléculas resultantes pueden someterse a una maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en la técnica.

60 El anticuerpo precursor no está limitado a anticuerpos que tienen un efecto natural, por ejemplo, una región Fc humana, pero también puede ser un anticuerpo que tiene otras mutaciones que las de la presente invención, como por ejemplo, mutaciones que afectan la glucosilación o permiten que el anticuerpo sea un anticuerpo biespecífico. Por la expresión "anticuerpo natural" se entiende cualquier anticuerpo que no comprende ninguna mutación introducida genéticamente. Un anticuerpo que comprende modificaciones producidas naturalmente, por ejemplo, alotipos diferentes, por lo tanto, debe entenderse como un "anticuerpo natural" en el sentido de la presente divulgación, y, por lo tanto, puede entenderse como un anticuerpo precursor. Dichos anticuerpos pueden servir como plantilla para la una o más mutaciones de acuerdo con la presente invención, y de ese modo proporcionar los anticuerpos variantes de la invención. Un ejemplo de un anticuerpo precursor que comprende otras mutaciones que las de la presente invención es el anticuerpo biespecífico como se describe en el documento WO2011/131746

(Genmab) u otras mutaciones relacionadas con cualquier anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento.

El anticuerpo precursor puede unirse a cualquier diana.

5 Los anticuerpos monoclonales se pueden producir, por ejemplo, mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos de fago utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas procedentes de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o mamíferos no humanos tales como ratas, perros, primates, etc.

15 El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra cualquier antígeno pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que transportan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en el presente documento como ratones HuMAb® y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos".

25 El ratón HuMAb® contiene un miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y cadena pesada (m y γ) humana no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena m y γ (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de la IgM de ratón o κ , γ , en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgG₁ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb® se describe en detalle en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuaille et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

40 Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una alteración JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (κ) (como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una alteración CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), y un transgén de cadena ligera κ humana KCo5 (como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Además, los ratones HCo7 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424), los ratones HCo17 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan los transgenes de cadena pesada y ligera κ de la inmunoglobulina humana en un fondo homocigoto para la interrupción de los loci endógenos de cadena pesada y ligera κ de ratón.

50 En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de cadena ligera κ de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de cadena pesada de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón lleva un transgén de cadena ligera κ humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también lleva un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF de cromosoma 14 (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478. Los ratones HCo12-Balb/C se pueden generar mediante el cruce de HCo12 con KCo5 [J/K] (Balb) como se describe en WO/2009/097006.

60 Los esplenocitos de estos ratones transgénicos pueden usarse para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

Además, cualquier región de unión a antígeno puede obtenerse a partir de anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies identificadas mediante tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica, y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en la materia, y las moléculas resultantes pueden someterse a una maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991) (presentación en fagos), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14, 309 (1996) (presentación en

fagos), Hanes y Pluchthau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992), y el documento US 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse.

Los sistemas para la expresión de la proteína y la variante de la presente divulgación son bien conocidos en la técnica para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, los descritos en el presente documento.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende la proteína de acuerdo con cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos en el presente documento.

Ácidos nucleicos y construcciones de expresión

En el presente documento también se divulga un ácido nucleico que codifica un primer o segundo polipéptido de acuerdo con la presente invención, donde los aminoácidos en la posición correspondiente a L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L y D. Se contempla además que el ácido nucleico que codifica un primer o segundo polipéptido de la presente divulgación comprende las sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos específicas descritas en el presente documento. Por lo tanto, el ácido nucleico puede codificar un primer o segundo polipéptido que tiene la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 20. En la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 20, las tres sustituciones de aminoácidos específicas L234F, L235E y D265A se han indicado con letras en negrita y subrayadas.

En el presente documento también se divulgan ácidos nucleicos que codifican una secuencia de un anticuerpo de CD3 humano, humanizado o quimérico para usar en la divulgación, vectores de expresión que codifican las secuencias de dicho anticuerpo, células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión, hibridomas que producen dichos anticuerpos y métodos para producir dicho anticuerpo mediante el cultivo de dichas células hospedadoras o hibridomas en condiciones apropiadas mediante las cuales se produce el anticuerpo y, opcionalmente, se recupera. Los anticuerpos de CD3 humanizados también se pueden denominar como "huCD3".

En el presente documento también se divulga un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 o 28.

En el presente documento también se divulga un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, o cualquier combinación de las mismas. El vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos de CDR3 de VH seleccionadas de las SEQ ID NO: 3 y 15. Como alternativa, el vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de VH seleccionada de las SEQ ID NO: 6, 7, 8 y 9. Como alternativa, el vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de VL seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12. Como alternativa, el vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera de anticuerpo humano, de una cadena pesada de anticuerpo humano, o ambas. Como alternativa, el vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena pesada de anticuerpo humano de SEQ ID NO: 13.

El vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de una o más de las secuencias de aminoácidos anteriores, teniendo dicha variante como máximo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como, como máximo 20, tal como, como máximo 15, 14, 13, 12, u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos, tal como deleciones o inserciones, preferentemente sustituciones, tales como sustituciones conservadoras, o al menos un 80 % de identidad con cualquiera de dichas secuencias, tal como al menos un 85 % de identidad o un 90 % de identidad o un 95 % de identidad, tal como un 96 % de identidad o un 97 % de identidad o un 98 % de identidad o un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente.

Un vector de expresión en el contexto de la presente divulgación puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo 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). Ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores procedentes de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácido nucleico vírico (ARN o ADN). Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de CD3 humanizado puede estar comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en Sykes y Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), 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 Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)), o como una construcción precipitada de vector de ácido nucleico, tal como una

construcción precipitada con CaPO_4^- (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y su uso son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

5 El vector puede ser adecuado para la expresión del anticuerpo de CD3 humanizado, el primer y el segundo polipéptidos en una célula bacteriana. Ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares.

10 Un vector de expresión también puede, o alternativamente, ser un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la 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: F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), y Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)).

20 Un ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigir un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica nascente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias son conocidas en la técnica e incluyen péptidos de señal o líder de secreción, secuencias dirigidas a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención de ER, secuencias de tránsito a la mitocondria, secuencias de tránsito al cloroplasto), secuencias de localización/anclaje de membrana (por ejemplo, secuencias de detención de transferencia, secuencias de anclaje GPI) y similares.

25 En un vector de expresión de la divulgación, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de CD3 y los ácidos nucleicos del primer y el segundo polipéptido pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión adecuados. Ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador de CMV IE humano, así como promotores RSV, SV40, SL3-3, MMTV y LTR de VIH), secuencias de terminación poli(A) eficaces, un origen de replicación para el producto plasmídico de *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable, y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como CMV IE (el experto en la materia reconocerá que dichos términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica bajo determinadas condiciones).

35 El vector de expresión que codifica el anticuerpo de CD3 y el vector de expresión del primer y el segundo polipéptido pueden colocarse en y/o administrarse a la célula hospedadora o animal hospedador a través de un vector vírico.

40 Dichos vectores de expresión pueden usarse para la producción recombinante de anticuerpos de CD3 y el primer y el segundo polipéptido.

Los anticuerpos de CD3 y el primer y el segundo polipéptido descritos en el presente documento pueden proporcionarse mediante el uso de una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce el anticuerpo. En consecuencia, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo de CD3, el primer y el segundo polipéptido, o inmunoglobulina como se define en el presente documento. Ejemplos de células hospedadoras incluyen células de levadura, bacterianas y de mamífero, tales como células CHO o HEK-293. Por ejemplo, la célula hospedadora puede comprender un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo de CD3 descrito en el presente documento. La célula hospedadora puede comprender un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un primer o un segundo polipéptido descrito en el presente documento. Como alternativa, la célula hospedadora puede comprender un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo de CD3, un primer o un segundo polipéptido descrito en el presente documento.

55 La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Debe entenderse que dichos términos están destinados a referirse no solo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir determinadas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula precursora, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK-293, PER.C6, células NS0 y linfocitos y células procariotas tales como *E. coli* y otros hospedadores eucariotas tales como células vegetales y hongos.

65 El término "transfectoma", como se usa en el presente documento, incluye células hospedadoras eucariotas

recombinantes que expresan el anticuerpo o un antígeno diana, tales como células CHO, PER.C6, células NS0, células HEK-293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

5 También se divulga en el presente documento un método para producir un anticuerpo divulgado en el presente documento, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora de la divulgación como se describe anteriormente en el presente documento, y
- b) recuperar y/o purificar el anticuerpo de la divulgación del medio de cultivo.

10 La secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de un anticuerpo puede codificar además una segunda fracción, tal como un polipéptido terapéutico. Los polipéptidos terapéuticos ejemplares se describen en otra parte del presente documento. También se divulga en el presente documento un método para producir una proteína de fusión de anticuerpos, comprendiendo dicho método las etapas de

- 15 a) cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende dicha secuencia de nucleótidos, y
- b) recuperar y/o purificar la proteína de fusión de anticuerpos del medio de cultivo.

20 Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína, tal como un anticuerpo, como se define en cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las divulgadas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

30 Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido, deben ser adecuados para la proteína, variante o anticuerpo y el modo de administración elegido. La idoneidad para los vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la falta de impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica elegida (por ejemplo, menos de un impacto sustancial (10 % o menos de inhibición relativa, 5 % o menos de inhibición relativa, etc.)) en la unión a antígeno.

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

45 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración concretos, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas o la amida de las mismas, la vía de administración, la hora de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, el peso, dolencia, salud general y antecedentes médicos anteriores del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

50 La composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier vía y modo adecuados. Las vías adecuadas para administrar una proteína, variante o anticuerpo *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la materia.

Se puede administrar una composición farmacéutica por vía parenteral.

60 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

65 La composición farmacéutica puede administrarse mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles con una proteína, variante o anticuerpo de la presente divulgación.

5 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, solución salina, suero salino tamponado con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (como el glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y las mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo, 10 soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o diversos tampones. Otros portadores son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos 15 medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida en la materia. 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 referirse a la proteína, el anticuerpo, la variante de una proteína precursora o un anticuerpo de 20 patente.

Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

25 Las composiciones farmacéuticas 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, como el palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tal como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 30 sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

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

35 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de dispersión, conservantes o tampones, que pueden potenciar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. La proteína, variante y anticuerpo de la presente divulgación pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, 40 parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poli-ortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. 45

Las proteínas, anticuerpos o variantes de una proteína precursora o anticuerpo precursor pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para administración 50 parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida en la materia. 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. Otros compuestos activos o terapéuticos también pueden incorporarse en las composiciones. 55

Las composiciones farmacéuticas para inyección normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente acuoso o no acuoso o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioles (como el glicerol, 60 propilenglicol, polietilenglicol y similares), y las mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una 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 sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede facilitarse 65 incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes, por ejemplo, enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, por ejemplo, de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, ejemplos de métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización), que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de una solución anteriormente esterilizada por filtrado del mismo.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en 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, ejemplos de métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización), que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de una solución anteriormente esterilizada por filtrado del mismo.

20 Aplicaciones terapéuticas

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, o composición farmacéutica de la invención como se define en cualquier aspecto o realización descrita en el presente documento, para su uso como un medicamento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una proteína, variante, anticuerpo o composición farmacéutica de la invención como se define en cualquier aspecto o realización descrita en el presente documento, para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

La proteína, variante, anticuerpo o composición farmacéutica de la invención se puede usar como en un tratamiento donde se desean mecanismos efectores de linfocitos T citotóxicos. Por ejemplo, la proteína, variante o anticuerpo puede administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar o prevenir trastornos tales como el cáncer, trastornos inflamatorios o autoinmunitarios. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" es normalmente un ser humano que responde a la proteína, variante, anticuerpo o composición farmacéutica. Los sujetos pueden incluir, por ejemplo, pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la modulación de una función diana o mediante la provocación de la destrucción de la célula, directa o indirectamente.

También se divulgan en el presente documento métodos para tratar o prevenir un trastorno, tal como cáncer, donde el reclutamiento de linfocitos T contribuiría al tratamiento o prevención, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, variante, anticuerpo o composición farmacéutica de la presente divulgación a un sujeto que lo necesite. El método normalmente implica administrar a un sujeto una proteína, variante o anticuerpo en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno.

También se divulga en el presente documento un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar la proteína, variante, anticuerpo o composición farmacéutica de la divulgación como se define en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso o al método de la invención como se define en cualquier aspecto y realizaciones descritas en el presente documento donde la enfermedad es cáncer, enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias.

Las células que sobreexpresan dianas específicas de tumor son dianas particularmente buenas para la proteína, variante o anticuerpo de la invención, ya que el reclutamiento de linfocitos T por una de las dos regiones de unión de la proteína, variante o anticuerpo desencadenará una actividad citotóxica de los linfocitos T. Este mecanismo es normalmente difícil de obtener, ya que el desencadenamiento de una actividad citotóxica no funciona correctamente en la eliminación de células cancerosas.

Las dosis y los regímenes de dosificación eficaces para la proteína, variante o anticuerpo dependen de la enfermedad o afección a tratar y se pueden determinar por los expertos en la materia.

Un médico con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico podría comenzar las dosis de la proteína, variante o anticuerpo 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 será la cantidad de proteína, variante o anticuerpo que es la dosis eficaz más baja

para producir un efecto terapéutico de acuerdo con un régimen de dosificación particular. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente.

5 Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para uso terapéutico puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede, por ejemplo, evaluarse en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad de la proteína, variante o anticuerpo para inhibir el crecimiento celular o para inducir citotoxicidad mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico, es decir, una proteína, variante, anticuerpo o

10 composición farmacéutica terapéutica, puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en dichos factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

15 Un intervalo no limitativo ejemplar para una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, variante o anticuerpo de la divulgación es de 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 o aproximadamente 10 mg/kg.

20 La administración puede, por ejemplo, ser intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y, por ejemplo, administrarse próximo al sitio de la diana.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

25

La eficacia del tratamiento puede controlarse durante la terapia, por ejemplo, en puntos predefinidos en el tiempo.

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

35 Si bien es posible que una proteína, variante o anticuerpo de la presente divulgación se administre solo, es preferible administrar la proteína, variante o anticuerpo como una composición farmacéutica como se describe anteriormente.

40 Una dosis eficaz de una proteína, variante o anticuerpo de la divulgación también se puede administrar usando un período de dosificación semanal, quincenal o trisemanal. El período de dosificación puede restringirse, por ejemplo, a 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido la progresión clínica.

45 La proteína, anticuerpo o variante puede administrarse mediante infusión en una dosis semanal calculada en mg/m^2 . Dichas dosis pueden, por ejemplo, basarse en las dosis de mg/kg proporcionadas anteriormente de acuerdo con lo siguiente: dosis (mg/kg) x 70: 1,8. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, 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. La proteína, anticuerpo o variante se puede administrar mediante infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir efectos secundarios tóxicos.

50 La proteína, anticuerpo o variante puede administrarse en una dosis semanal calculada como una dosis fija hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces cuando se administra una vez a la semana. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. Dichas dosis fijas pueden, por ejemplo, basarse en las dosis de mg/kg proporcionadas anteriormente, con una estimación de peso corporal de 70 kg. La dosis puede determinarse o ajustarse mediante la medición de la cantidad de proteína, anticuerpo o variante de la presente divulgación en la sangre tras la administración mediante, por ejemplo, la toma de una muestra biológica y usando anticuerpos antidiotípicos que se dirigen a la región de unión de las proteínas, anticuerpos o variantes de la presente divulgación.

55

60 La proteína, anticuerpo o variante puede administrarse mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

Una proteína, anticuerpo o variante 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.

65

Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de unidad de dosificación para facilitar la

administración y la uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr y de (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Una proteína, variante, o anticuerpo 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

La proteína no activadora también puede usarse para fines de diagnóstico, usando una composición que comprende una proteína como se describe en el presente documento. En el presente documento también se divulgan métodos y composiciones de diagnóstico que usan las proteínas descritas en el presente documento. Dichos métodos y composiciones se pueden usar con fines puramente de diagnóstico, tales como detectar o identificar una enfermedad, así como para controlar el progreso de los tratamientos terapéuticos, controlar la progresión de la enfermedad, evaluar el estado después del tratamiento, controlar la recurrencia de la enfermedad, evaluar el riesgo de desarrollar la enfermedad y similares.

La proteína de la presente invención puede usarse *ex vivo*, tal como para diagnosticar una enfermedad en la que las células que expresan una diana específica de interés y a las que se une la proteína, son indicativas de enfermedad o están implicadas en la patogénesis, mediante la detección de niveles de la diana o niveles de células que expresan la diana de interés en su superficie celular en una muestra tomada de un paciente. Esto se puede lograr, por ejemplo, poniendo en contacto la muestra a analizar, opcionalmente junto con una muestra de control, con la proteína de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la unión de la proteína a la diana. Entonces se puede detectar la formación de complejos (por ejemplo, usando un ELISA). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de prueba, se analiza el nivel de proteína o de complejo de proteína-diana en ambas muestras y un nivel estadísticamente significativo más alto de proteína o complejo de proteína-diana en la muestra de prueba indica un nivel más alto de la diana en la muestra de prueba comparada con la muestra de control.

Ejemplos de inmunoensayos convencionales en los que se pueden usar proteínas de la presente invención incluyen, sin limitación, ELISA, RIA, ensayos FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia de Western y/o inmunoprecipitación.

La divulgación 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 una proteína de la invención en condiciones que permitan la unión de la proteína a la diana en la muestra; y
- analizar si se ha formado un complejo. Normalmente, la muestra es una muestra biológica.

La muestra puede ser una muestra de tejido conocida o sospechosa de contener una diana específica y/o células que expresan la diana. Por ejemplo, la detección *in situ* de la expresión de dianas se puede lograr mediante la eliminación de una muestra histológica de un paciente y proporcionando la proteína a dicha muestra. La proteína puede proporcionarse mediante la aplicación o superposición de la proteína a la muestra, que luego se detecta utilizando medios adecuados. Entonces es posible determinar no solo la presencia de las dianas o de las células que expresan la diana, sino también la distribución de las dianas o de las células que expresan la diana en el tejido examinado (por ejemplo, en el contexto de evaluar la propagación de las células cancerosas). Los expertos en la materia percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) pueden modificarse para lograr dicha detección *in situ*.

En los ensayos anteriores, la proteína se puede marcar con una sustancia detectable para permitir que se detecte la proteína unida. Como alternativa, la proteína específica unida (principal) puede ser detectada mediante un anticuerpo que está marcado con una sustancia detectable y que se une a la proteína específica principal.

El nivel de dianas en una muestra también puede estimarse mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones de diana marcados con una sustancia detectable y una proteína específica de diana sin marcar. En este tipo de ensayo, la muestra biológica, el patrón(es) de diana marcado y la proteína específica de diana se combinan, y se determina la cantidad de patrón de diana marcado unido a la proteína específica de diana no marcada. La cantidad de diana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de diana marcado unido a la proteína específica de diana.

Los marcadores adecuados para la proteína específica de diana, el anticuerpo secundario y/o el patrón de diana utilizados en las técnicas de diagnóstico *in vitro* incluyen, sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^3H .

Las proteínas específicas de diana de la divulgación pueden usarse en la formación de imágenes *in vivo* de tejidos que expresan la diana, tales como tumores. Para métodos *in vivo*, los fragmentos de anticuerpo tales como, por ejemplo, fragmentos (Fab')₂, Fab y Fab', son particularmente ventajosos debido a su rápida cinética de distribución.

La formación de imágenes *in vivo* se puede realizar mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, una proteína específica de diana (tal como, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento) marcada con ^{99}Tc , ^{131}I , ^{111}In u otro isótopo emisor de rayos gamma puede usarse para obtener imágenes de la acumulación o distribución de proteínas específicas de diana en tejidos que expresan la diana tal como tumores con una cámara de centelleo gamma (por ejemplo, un dispositivo Elscint Apex 409ECT), que normalmente utiliza un colimador de baja energía y alta resolución o un colimador de uso múltiple de baja energía. Como alternativa, el marcado con ^{89}Zr , ^{76}Br , ^{18}F u otro radionúclido emisor de positrones se puede usar para obtener imágenes de la distribución de proteínas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos de diana en tumores usando tomografía por emisión de positrones (PET, de sus siglas en inglés). Las imágenes obtenidas mediante el uso de dichas técnicas pueden usarse para evaluar la biodistribución de la diana en un paciente, mamífero o tejido, por ejemplo en el contexto de usar la diana como un biomarcador para la presencia de células cancerosas/tumorales. Las variaciones en esta técnica pueden incluir el uso de imágenes de resonancia magnética (MRI, de sus siglas en inglés) para mejorar las imágenes sobre las técnicas de cámara gamma. Los métodos y principios convencionales de inmunocintigrafía se describen en, por ejemplo, Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro et al., (eds.), págs. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", en Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993). Por otro lado, dichas imágenes también pueden, o alternativamente, servir como base para técnicas quirúrgicas para extirpar tumores. Además, dichas técnicas de imagen *in vivo* pueden permitir la identificación y localización de un tumor en una situación donde se identifica a un paciente con un tumor (debido a la presencia de otros biomarcadores, metástasis, etc.), pero el tumor no se puede identificar mediante técnicas analíticas tradicionales.

Las imágenes *in vivo* y otros métodos de diagnóstico proporcionados por la presente divulgación son particularmente útiles en la detección de micrometástasis en un paciente humano (por ejemplo, un paciente no diagnosticado previamente con cáncer o un paciente en un período de recuperación/remisión de un cáncer).

Se divulga un método de obtención de imágenes *in vivo* donde se conjuga una proteína específica de diana con un agente radiopaco que promueve la detección, se administra la proteína conjugada a un hospedador, tal como mediante inyección en el torrente sanguíneo, y se analiza la presencia y ubicación de la proteína marcada en el hospedador. Mediante esta técnica y cualquier otro método de diagnóstico proporcionado en el presente documento, se divulga un método para detectar 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 de una proteína específica de diana antes de la terapia ADC específica de diana.

Para el diagnóstico por imagen, los radioisótopos pueden unirse a una proteína específica de diana, ya sea directa o indirectamente, utilizando un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermediarios útiles incluyen quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriaminopentaacético (véase, por ejemplo, el documento US 5.057.313).

Además de los radioisótopos y los agentes radiopacos, los métodos de diagnóstico se pueden realizar utilizando proteínas específicas de diana que se conjugan con colorantes (tal como con el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos fluorescentes o moléculas y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos) para imágenes de resonancia magnética (MRI) (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.331.175, que describe técnicas de MRI y la preparación de proteínas conjugadas con un agente potenciador de MRI). Dichos agentes de diagnóstico/detección pueden seleccionarse de agentes para uso en MRI y compuestos fluorescentes. Para cargar una proteína específica de diana con metales radioactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerla reaccionar con un reactivo que tiene una cola larga a la que se unen múltiples grupos quelantes para unir los iones. Dicha 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, por ejemplo, porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioxima y grupos similares conocidos para ser útiles para este propósito. Los quelatos se pueden acoplar a proteínas específicas de diana utilizando productos químicos estándar.

En el presente documento también se divulga una proteína de diagnóstico específica de diana, donde la proteína específica de diana se conjuga con un agente de contraste (tal como para imágenes de resonancia magnética, tomografía computarizada o agente potenciador del contraste de ultrasonido) o un radionúclido que puede ser, por ejemplo, un isótopo emisor de positrones o electrones gamma, beta, alfa o Auger.

5 En el presente documento también se divulga un kit para detectar la presencia de antígeno diana o una célula que expresa la diana, en una muestra, que comprende:

- 10 - un anticuerpo específico de diana de la divulgación; y
 - instrucciones para el uso del kit.

También se divulga en el presente documento un kit para el diagnóstico de cáncer que comprende un recipiente que comprende una proteína específica de diana, y uno o más reactivos para detectar la unión de la proteína específica de diana a la diana. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos u otros marcadores detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos o reactivos secundarios o terciarios para reacciones enzimáticas, donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse. También se divulga en el presente documento un kit de diagnóstico que comprende una o más proteínas específicas de diana de la presente divulgación en forma marcada o no marcada en recipiente(s) adecuado(s), reactivos para las incubaciones para un ensayo indirecto y sustratos o agentes de derivación para la detección en dicho ensayo, dependiendo de la naturaleza del marcador. También se pueden incluir reactivos de control e instrucciones de uso.

Los kits de diagnóstico también se pueden suministrar para su uso con una proteína específica de diana, tal como una proteína específica de diana marcada, para la detección de la presencia de la diana en una muestra de tejido u hospedador. En dichos kits de diagnóstico, así como en kits para usos terapéuticos descritos en otra parte en el presente documento, una proteína específica de diana puede proporcionarse normalmente en forma liofilizada en un recipiente, solo o junto con anticuerpos adicionales específicos para una célula o péptido diana. Normalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un diluyente inerte) y/o componentes del mismo, tal como un tampón Tris, fosfato o carbonato, estabilizantes, conservantes, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, albúmina sérica o similares, también son incluidos (generalmente en un recipiente separado para mezclar) y reactivos adicionales (normalmente también en recipientes separados). En determinados kits, también se incluye un anticuerpo secundario capaz de unirse a la proteína específica de diana, que normalmente está presente en un recipiente separado. El segundo anticuerpo normalmente se conjuga con un marcador y se formula de una manera similar a la proteína específica de diana de la presente divulgación. Usando los métodos descritos anteriormente y en otras partes en el presente documento, las proteínas específicas de diana pueden usarse para definir subconjuntos de células cancerosas/tumorales y caracterizar dichas células y tejidos tumorales relacionados.

Secuencias

SEQ ID NO:	Nombre del clon	Secuencia
SEQ ID NO: 1	huCD3 VH CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO: 2	huCD3 VH CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO: 3	huCD3 VH CDR3	VRHGNGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 4	huCD3 VL CDR1	TGAVTTSNY
	huCD3 VL CDR2	GTN
SEQ ID NO: 5	huCD3 VL CDR3	ALWYSNLWW
SEQ ID NO: 6	huCD3 VH1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTV SS
SEQ ID NO: 7	huCD3 VH2	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTV SS
SEQ ID NO: 8	huCD3 VH3	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYL QMNSLKTEDTAMYYCVRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTV SS

ES 2 792 199 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre del clon	Secuencia
SEQ ID NO: 9	huCD3 VH4	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSACAASGFTFNTYAMNWWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYL QMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGGQTMVTV SS
SEQ ID NO: 10	huCD3 VL1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT PGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQAD DESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 11	huCD3 VL2	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT PGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQAD DESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 12	huCD3 VL3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT PGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQAD DESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 13	Región constante de cadena pesada de IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWOOGNVFCFSVMHEALHNHYTOKLSLSLSPGK
SEQ ID NO: 14	Cd3ε (épsilon) humano maduro	QDGNEEMGGITQTPYKVISGTTVILTCPQYPGSEILWQHND KNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKP EDANFYLYLRARVCENCMEMDMMSVATIVIVDICITGGLLLV YYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPPNDYE PIRKGORDLYSGLNORRI
SEQ ID NO: 15	Cd3δ (delta) humano	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELDRVFNVCNTSITWV EGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQ VHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHET GRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWAR K
SEQ ID NO: 16	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSACAASGFTFSSYGMFWVRQAP GKGLEWVATISRYRYIYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARRPLYGSSPDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 17	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQA PRLLIYDTSKLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYY CFQGGSGYPLTFGSGTKLEMR
SEQ ID NO: 18	VH HER2 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYGISWVRQAP GQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYME LRSLRSDDTAVYYCARDIVRVPDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 19	VL HER2 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVY YCQQRSNWPRTFGQGTKEIK

(continuación)

SEQ ID NO:	Nombre del clon	Secuencia
SEQ ID NO: 20	región constante de cadena pesada de IgG1m(f) - LFLEDA	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVKDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO: 21	Cd3ε (épsilon) de macaco cangrejero maduro	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHN GKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLY LKARVCENCMEMDVMVAVATIVIVDICITLGLLLL V YWSKNRK AKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVNPDPYEPKRGQQD LYSGLNQ R RI

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de anticuerpos no activadores

5

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 células sanguíneas, tales como monocitos, o con C1q para activar la vía clásica del complemento. La reducción de la actividad de 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 F405L. Se generaron las siguientes variantes de dominio Fc: NQ (se refiere a la sustitución N297Q), LFLE (se refiere a las sustituciones L234F/I235E), LALA (se refiere a las sustituciones L234A/I235A), LFLENQ (se refiere a las sustituciones L234F/I235E/N297Q), LFLEDA (se refiere a las sustituciones L234F/I235E/D265A), DA (se refiere a la sustitución D265A), DAPS (se refiere a las sustituciones D265A/P331S), DANQ (se refiere a las sustituciones D265A/N297Q), LFLEPS (se refiere a las sustituciones L234F/I235E/P331S) y LFLEDANQPS (se refiere a las sustituciones L234F/I235E/D265A/N297Q/P331S).

Anticuerpos de CD3

Se usaron varios anticuerpos de CD3 en formato mono específico y biespecífico.

25

En algunos ejemplos, se usaron las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de huCLB-T3/4 (SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente), que es una versión humanizada del anticuerpo murino CLB-T3/4. Ambas secuencias se clonaron en los vectores de expresión relevantes y se expresaron mediante transfección conjunta en células HEK293F.

30

En algunos ejemplos, se utilizó una variante humanizada (VH de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 y VL de acuerdo con la SEQ ID NO: 10) de un anticuerpo de CD3 murino (descrito como "huCD3") como se describe en el documento US 8.236.308. La humanización de este anticuerpo de CD3 fue realizada por Antitope (Cambridge, Reino Unido) usando su versión mejorada de la tecnología de humanización de la línea germinal (CDR-grafting), como se describe en el documento EP 0 629 240. Usando 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).

35

Anticuerpo de HER2

En algunos de los ejemplos se usó un anticuerpo contra HER2. Las secuencias de VH y VL para este anticuerpo específico de HER2 (VH HER2 169 y VL Her2 160 SEQ ID NO: 18 y 19, respectivamente) se describe en el documento WO2012143524 [Genmab]; y en Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50.

40

Anticuerpo de b12

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

45

Expresión

5 Los anticuerpos se expresaron como IgG1, κ o IgG1, λ con o sin las mutaciones no activadoras descritas anteriormente y se modificaron adicionalmente en sus regiones Fc de la siguiente manera: 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 de manera transitoria a células HEK293F de Freestyle (Invitrogen, EE UU.) utilizando 293fectina (Invitrogen, EE.UU.) esencialmente como lo descrito por el fabricante.

10 Purificación de anticuerpos

El sobrenadante de cultivo se filtró sobre filtros sin salida de 0,2 μ m, se cargó en columnas de 5 ml MabSelect SuRe (GE Health Care) y se eluyó con NaOH-citrato de sodio 0,1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con HCl-Tris 2 M, pH 9 y se dializó durante la noche con NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Como alternativa, después de la purificación, el eluato se cargó en una columna de desalinización HiPrep y el anticuerpo se intercambió en tampón NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis o el intercambio de tampón, las muestras se filtraron de manera estéril sobre filtros sin salida de 0,2 μ m. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración se midió mediante absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos purificados se almacenaron a 4 °C.

20 Generación de anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos se generaron *in vitro* de acuerdo con la plataforma de tecnología DuoBody®, es decir, el intercambio de brazo Fab inducido por 2-MEA como se describe en 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). La base de este método es el uso de regiones CH3 complementarias, que promueven la formación de heterodímeros en condiciones de ensayo específicas. Para permitir la producción de anticuerpos biespecíficos mediante este método, se generaron moléculas de IgG1 que llevan determinadas mutaciones en la región CH3: en uno de los anticuerpos de IgG1 precursores, la mutación F405L, en el otro anticuerpo de IgG1 precursor, la mutación K409R. Para generar anticuerpos biespecíficos, estos dos anticuerpos precursores, 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 μ l TE a 31 °C durante 5 horas. La reacción de reducción se detuvo cuando se eliminó el agente reductor 2-MEA usando columnas PD-10 (Ge-healthcare, producto n.º 17-0851-01), equilibrado con 25 ml de PBS. Antes de la desalación, se añadieron 2 ml de PBS (B. Braun, producto n.º 3623140) a las muestras para ajustar el volumen a 2,5 ml. La elución se realizó en 3,5 ml de PBS. Las muestras se recolectaron en unidades centrifugas Amicon Ultra (30 kD MWCO, Millipore, producto n.º UFC803096) y concentradas mediante centrifugación durante 8 minutos a 3000 xg. Los volúmenes se ajustaron a 500 μ l (cuando fue necesario) con PBS y las muestras se filtraron de manera estéril sobre un filtro de 0,2 μ m (Millex-GV, producto n.º SLGV004SL). Los productos biespecíficos se almacenaron a 2-8 °C.

40 **Ejemplo 2 - Unión de mutantes de anticuerpos a células Jurkat o AU565**

La unión de variantes purificadas de anticuerpos de IgG1-CD3 (huCLB-T3/4, que contienen la mutación F405L), IgG1-HER2 (HER2-169, que contienen la mutación K409R) y moléculas biespecíficas (bs)IgG-CD3 x HER2 con mutaciones adicionales en el dominio Fc (véase el Ejemplo 1) a células Jurkat CD3 positivas o células AU565 HER2 positivas se analizó mediante análisis FACS. Se incubaron células (1x10⁵ células/pocillo) en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (Greiner bio-one 650101) con diluciones en serie de preparaciones de anticuerpos (intervalo de 2 a 10000 ng/ml en diluciones de 4 veces para células Jurkat e intervalo de 1 a 3000 ng/ml en diluciones de 4 veces para células AU565) en 100 μ l de PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % a 4 °C durante 30 minutos.

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

60 La unión de las variantes de anticuerpos de IgG1-CD3 y bslgG1-CD3 x HER2 a células Jurkat no se vio afectada por la introducción de las mutaciones indicadas en el dominio Fc y fue idéntica para todos los mutantes probados y el anticuerpo de tipo silvestre (**Figura 1A y 1B y Figura 2A y 2B**).

65 De manera similar, la unión de las variantes de anticuerpos de IgG1-HER2 y bslgG1-CD3 x HER2 a células AU565 no se vio afectada por la introducción de las mutaciones indicadas en el dominio Fc y fue idéntica para todos los mutantes probados y el anticuerpo de tipo silvestre (**Figura 1C y 1D y Figura 2C y 2D**).

Ejemplo 3: Expresión de CD69 en linfocitos T en cultivo de PBMC

La expresión de CD69 en linfocitos T se evaluó mediante análisis FACS para determinar la activación temprana de linfocitos T después de la incubación con anticuerpos de IgG1-CD3 con mutaciones en el dominio Fc (véase el Ejemplo 1).

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

Se preparó una serie de respuesta a la dosis de variantes de anticuerpos de IgG1-CD3, un control negativo (Fab de IgG1-CD3) y un control positivo (IgE-CD3) en medio de cultivo (que varía de 1 a 1000 ng/ml en diluciones de 3 veces) 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 mediante centrifugación y el sobrenadante (que contenía citocinas) se recogió y almacenó a -20 °C. Luego, las células se lavaron con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con un anticuerpo de ratón anti-CD28-PE humano (854.222.010; Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos; marcador de linfocitos T) y anticuerpo de ratón anti-CD69-APC humano (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 CD28 positivas en FACS Canto II (BD Biosciences).

La **Figura 3** muestra que la expresión de CD69 fue alta en las células que se incubaron con IgG1-CD3, IgG1-CD3-DA e IgG1-CD3-DAPS. La incubación con IgG1-CD3-N297Q e IgG1-CD3-LALA indujo niveles de expresión algo más bajos de CD69 en comparación con IgG1-CD3 de tipo silvestre, y la incubación con IgG1-CD3-LFLE e IgG1-CD3-LFLEPS indujo CD69 en menor medida. La incubación de PBMC con Fab de IgG1-CD3, anticuerpos IgG1-b12, IgG1-CD3-LFLEDA, IgG1-CD3-LFLENQ, IgG1-CD3-DANQ e IgG1-CD3-LFLEDANQPS no indujo ninguna expresión de CD69 en las linfocitos T.

Ejemplo 4 - Proliferación de linfocitos T inducida por anticuerpos de CD3

El efecto de las variantes de anticuerpos de CD3 (descritas en el Ejemplo 1) sobre la proliferación de linfocitos T se evaluó mediante el kit ELISA de proliferación celular de Roche Applied Science (Cell Proliferation ELISA), BrdU kit, n.º 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 dilución (que varían 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 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 ELISA.

La incorporación de BrdU en el ADN se determinó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cell Proliferation ELISA, BrdU kit, n.º 11647229001; Roche Applied Science). Las células se fijaron a las placas, donde después se incubaron las placas durante 90 minutos a temperatura ambiente (TA) con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. Las placas se lavaron con PBST y la unión se detectó usando tampón ABTS (en lugar de la solución 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. La DO405 nm se midió luego en un lector ELISA EL808.

La **Figura 4** muestra que la incubación de PBMC con IgG1-CD3, IgG1-CD3-DA e IgG1-CD3-DAPS indujo una fuerte proliferación de linfocitos T, incluso a concentraciones muy bajas de anticuerpo. La incubación con IgG1-CD3-N297Q o IgG1-CD3-LALA indujo una proliferación dependiente de la dosis, que fue comparable al control positivo de IgE-CD3. La incubación de PBMC con Fab de IgG1-CD3, anticuerpos IgG1-b12, IgG1-CD3-LFLE, IgG1-CD3-LFLEDA, IgG1-CD3-LFLENQ, IgG1-CD3-LFLEPS, IgG1-CD3-DANQ e IgG1-CD3-LFLEDANQPS no indujo ninguna proliferación de linfocitos T.

Basándose en los resultados en los Ejemplos 3 y 4, un subconjunto de mutantes que se consideraron menos activadores, se sometió a un análisis adicional.

Ejemplo 5 - Citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* inducida por variantes de anticuerpos no activadores

Se cultivaron células AU565 (carcinoma de mama humano) en RPMI 1640 complementado con CCS inactivado por calor al 10 % (vol/vol), bicarbonato de sodio 1,5 g/l (Lonza), piruvato de sodio 1 mM, glucosa 4,5 g/l (Sigma),

penicilina 50 UI/ml y estreptomycinina 50 µg/ml. La línea celular se mantuvo a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ 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 5x10⁴ células en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos, y las células se incubaron al menos 3 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir la adherencia a la placa.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de la sangre de voluntarios sanos usando tubos de 30 ml de 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 en una proporción 1:1 a las células tumorales AU565 en las placas de 96 pocillos. El porcentaje de linfocitos T presentes en las PBMC se midió mediante análisis FACS, usando un anticuerpo de ratón anti-CD3-PerCP humano (BD, n.º 345766) (para teñir linfocitos T). El contenido de linfocitos T en la población de PBMC usadas fue normalmente de un 50 a un 60 %.

Se prepararon en el medio de cultivo series de dilución (concentraciones finales que varían de 0,004 a 1000 ng/ml) de IgG1-b12, IgG1-CD3, IgG1-HER2 y anticuerpos biespecíficos CD3xb12 y CD3xHER2 expresados como diferentes variantes de Fc, tipo silvestre, N297Q, LFLE, LALA, LFLENQ, LFLEDA, DANQ y LFLEDENQPS, y se añadieron a las placas. Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %. La incubación de células con estaurosporina 1 µM (N.º S6942-200, Sigma) se usó como referencia para el 100 % de destrucción de células tumorales. Después de la incubación, los sobrenadantes se eliminaron y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis de la liberación de citocinas (véase el Ejemplo 6). Las placas se lavaron dos veces con PBS, y se añadieron 150 µl de medio de cultivo que contenía azul de Alamar al 10 % a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se midió la absorbancia a 590 nm (Envision, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Se realizaron dos experimentos usando PBMC de diferentes donantes. En el primer experimento, se probaron las variantes de Fc N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ y LFLEDANQPS (**Figura 5A-G**). En el segundo experimento, se probaron las variantes de Fc LFLEDA y LALA (**Figura 6A-C**). Los anticuerpos con dominios Fc de tipo silvestre se incluyeron en ambos experimentos como referencia. La incubación con anticuerpos de IgG1-CD3 mono-específicos de tipo silvestre o CD3xb12 biespecíficos indujo la destrucción inespecífica de células diana (**Figuras 5A-G y 6A-C**). Las variantes mono-específicas de IgG1-CD3 y bslgG1-CD3xb12 N297Q (**Figura 5A-G**) y LALA (**Figura 6A-C**) todavía indujeron alguna destrucción inespecífica de células diana, aunque en menor medida que el anticuerpo de tipo silvestre probado en el mismo experimento. La destrucción inespecífica no fue inducida por ninguno de los otros anticuerpos de IgG1-CD3 o bslgG1-CD3xb12 probados con mutaciones no activadoras (**Figuras 5A-G y 6A-C**).

Todos los anticuerpos biespecíficos de CD3xHER2 indujeron la destrucción dependiente de la dosis de células AU565 con una eficacia al menos comparable en comparación con el anticuerpo biespecífico de CD3xHER2 de tipo silvestre sin mutaciones no activadoras (**Figuras 4A-G y 6A-C**). La destrucción máxima ocurrió a concentraciones muy bajas.

No se indujo citotoxicidad por variantes de tipo silvestre o no activadoras de los anticuerpos mono-específicos de b12 o HER2 (**Figuras 4A-G y 6A-C**).

Ejemplo 6 - Liberación de citocinas inducida por variantes de anticuerpos no activadores

Las citocinas presentes en las muestras de sobrenadante de los ensayos de citotoxicidad tal como se realizaron en el Ejemplo 5 se cuantificaron usando el kit Proinflamatorio (MSD, n.º K15007B-1).

En resumen, se añadieron muestras de sobrenadante y calibrador a las placas múltiples y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1x solución de anticuerpo de detección, que se proporcionó con el kit, a los pocillos y se incubó durante otras 1-2 horas. Las placas se lavaron 3 veces con PBST, se añadió tampón de lectura T a los pocillos y se midió la quimioluminiscencia en un generador de imágenes. Las concentraciones de citocinas se calcularon utilizando las curvas estándar obtenidas de las muestras del calibrador.

Los resultados de la producción de 9 citocinas (IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) se muestran en la **Figura 7A-I**. IgG1-CD3 de tipo silvestre indujo la producción de las 9 citocinas analizadas en varias cantidades. La incubación de células diana y efectoras con las variantes de anticuerpos mono-específicos de IgG1-CD3 LFLENQ, LFLEDA, DANQ y LFLEDANQPS no condujo a una producción sustancial de IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-10, y la producción de pequeñas cantidades de IL-8 e IL-12. La incubación de células diana y efectoras con la variante mono-específica de IgG1-CD3-LALA indujo la producción de grandes cantidades de IL-8, la producción de bajas cantidades de 7 citocinas (IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) y ninguna cantidad sustancial de IL-2.

Los anticuerpos biespecíficos de IgG1-CD3xHER2, tanto variantes de tipo silvestre como no activadoras, indujeron la producción de las 9 citocinas (**Figura 7A-I**). La producción de citocinas inducida por los anticuerpos biespecíficos de IgG1-CD3xHER2 fue algo mayor en comparación con la producción de citocinas inducida por el control mono-específico de IgG1-CD3 de tipo silvestre, con la excepción de la producción de IL-1 β e IL-2.

Ejemplo 7 - Evaluación de la unión de C1q a variantes de anticuerpos no activadores

La interacción de C1q con anticuerpos unidos a una célula diana es la primera etapa en la vía clásica de activación del complemento. Como la IgG1 de tipo silvestre 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 dilución (intervalo de 7-30000 ng/ml en diluciones de 4 veces) de IgG1-CD3, bslgG1-CD3xHER2 e IgG1-CD20 (control positivo) y variantes de anticuerpos no activadores como se describió anteriormente en el Ejemplo 1 de las mismas se revistieron en placas Microlon de 96 pocillos para ELISA (Greiner, Alemania) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y bloquearon con PBS complementado con Tween 20 al 0,025 % y gelatina al 0,1 %. Con lavados entre incubaciones, las placas se incubaron secuencialmente con suero humano agrupado al 3 % (Sanquin, producto n.º M0008) durante 1 hora a 37 °C, con 100 µl/pocillo de anticuerpo de conejo anti-C1q humano (DAKO, producto n.º A0136, 1/4.000) durante 1 hora a TA, y con 100 µl/pocillo de anticuerpo porcino anti-IgG-HRP de conejo (DAKO, P0399, 1:10.000) como anticuerpo de detección durante 1 hora a TA. 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 de log transformados se analizaron ajustando curvas de dosis-respuesta sigmoidales con pendiente variable utilizando el programa informático GraphPad Prism.

C1q mostró unión a los anticuerpos con las regiones Fc de IgG1 de tipo silvestre, IgG1-CD20, IgG1-CD3 y bslgG1 CD3xHER2 (**Figura 8**). No se detectó unión de C1q en todas las variantes de anticuerpos evaluadas con mutaciones no activadoras (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DA, DAPS, DANQ, LFLEPS, LFLEDANQPS, LALA) (**Figura 8**).

Ejemplo 8 - Unión de variantes de anticuerpos no activadores a FcγRI

La unión de las variantes de anticuerpos de IgG1-CD3 N297Q, LFLE, LFLEDA, LFLENQ, DANQ, LFLEDANQPS y LALA al FcγRI de alta afinidad expresado por las células Ila1.6 FcγRI se evaluó mediante análisis FACS.

Se cultivaron células Ila1.6 FcγRI (Van Vugt et al. Blood 1999, 94: 808-817) en medio RPMI complementado con suero de ternera Cosmic al 10 %, metotrexato 25 mg/ml (55 mM), penicilina 50 UI/ml y estreptomycin 50 µg/ml. La línea celular se mantuvo a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol).

Se incubaron células Ila1.6 FcγRI (1x10⁵ células/pocillo) con diluciones en serie de preparaciones de anticuerpos (intervalo de 10 a 10000 ng/ml en diluciones de 4 veces) durante 30 minutos a 4 °C en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno (Greiner bio-one, n.º 650101). Las células se lavaron con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana conjugada con R-Ficoeritrina (PE) (109-116-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluido 1/100 en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %. Después, las células se lavaron con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 150 µl PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02 % y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences). Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

El anticuerpo de IgG1-CD3 de tipo silvestre mostró una fuerte unión a FcγRI (**Figura 9**). Las variantes de anticuerpos de IgG1-CD3 N297Q y LALA mostraron una unión débil a FcγRI en células FcγRI Ila1.6 cuando se probaron a concentraciones más altas (> 1000 ng/ml; **Figura 9**). No se observó una unión sustancial a las células Ila1.6 FcγRI para las variantes de anticuerpos LFLE, LFLEDA, LFLENQ, DANQ y LFLEDANQPS (**Figura 9**).

Ejemplo 9 - Análisis farmacocinético (PK) de variantes de anticuerpos no activadores

Los ratones en este estudio se alojaron en una unidad de barrera del Central Laboratory Animal Facility (Utrecht, Países Bajos) y se mantuvieron en jaulas con filtro superiores con agua y alimentos provistos a demanda. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética animal de la Universidad de Utrecht. Se inyectaron por vía intravenosa ratones de SCID CB-17 de 7-10 semanas de edad (CB-17/lcr-Prkdc <Scid>/lcrCoCrl, Charles-River) con 100 µg de anticuerpo de tipo silvestre (IgG1-CD3, IgG1-HER2 o bslgG CD3xHER2) o variantes no activadoras de los mismos (LALA, LFLEDA, LFLENQ, DANQ o LFLEDANQPS) usando 3 ratones por grupo. Se recogieron muestras de sangre de 50 µl 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 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 usando un ELISA sándwich de hIgG total. Para este ensayo, se usó el clon MH16 del AcM de ratón anti-IgG-kappa (n.º M1268, CLB Sanquin, Países Bajos), recubierto con placas Microlon de 96 pocillos para ELISA (Greiner, Alemania) a una concentración de 2 µg/ml como anticuerpo de captura. Después de bloquear las placas con PBS complementado con seroalbúmina bovina al 0,2 %, se añadieron

muestras, diluidas en serie con tampón ELISA (PBS complementado con Tween 20 al 0,05 % y seroalbúmina bovina al 0,2 %), y se incubaron en un agitador de placa durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Las placas se incubaron posteriormente con inmunoglobulina de cabra anti-IgG humana (n.º 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 un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm.

Las tasas de eliminación plasmática (ml/día/kg) se calcularon en función del área bajo la curva (ABC), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Eliminación plasmática} = \frac{\text{Dosis } (\mu\text{g/kg})}{\text{ABC } (\mu\text{g/ml/día})}$$

El análisis de datos se realizó con el programa informático Graphpad prism.

La **Figura 10A** 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 silvestre. Las concentraciones de IgG humana en plasma para las variantes de anticuerpos LFLEDA y LALA fueron similares a las de los anticuerpos de tipo silvestre.

La **Figura 10B** muestra que las tasas de eliminación plasmática de las variantes de anticuerpos N297Q, DANQ y LFLENQ fueron de 2 a 3 veces mayores que las del anticuerpo de tipo silvestre. La tasa de eliminación de la variante de anticuerpo LFLEDANQPS fue 3-5 veces mayor que la del anticuerpo de tipo silvestre. Las tasas de eliminación plasmática de las variantes de anticuerpos LFLEDA y LALA fueron similares a las del anticuerpo de tipo silvestre.

25 **Ejemplo 10 - Unión de anticuerpos de CD3 humanizados y variantes no activadoras de los mismos a líneas de linfocitos T humanas y de macaco cangrejero**

Se analizó la unión de variantes purificadas de anticuerpos de CD3 humanizados (huCD3) y moléculas biespecíficas de (bs)IgG1-huCD3 x HER2 con o sin mutaciones LFLEDA en el dominio Fc (véase el Ejemplo 1) a la línea de linfocitos T humanos Jurkat o a la línea de linfocitos T humanos de macaco cangrejero HSC-F mediante análisis FACS. Además de las mutaciones no activadoras, las variantes del anticuerpo LFLEDA comprenden mutaciones F405L o K409R como se describe en el Ejemplo 1.

Se incubaron células (1×10^5 células/pocillo) en placas de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos (Greiner bio-one 650101) con diluciones en serie de preparaciones de anticuerpos (intervalo de 5 a 10.000 ng/ml en diluciones de 3 veces) en 100 μ l de PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % a 4 °C durante 30 minutos.

Después de lavar dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, las células se incubaron en 100 μ l con anticuerpo secundario a 4 °C durante 30 minutos. Como anticuerpo secundario, se usó en todos los experimentos F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana 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 %. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 %, se resuspendieron en 150 μ l PBS/BSA al 0,1%/azida al 0,02 % y se analizaron en un FACS Cantoll (BD Biosciences). Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

La **Figura 11A** muestra que la unión a las células Jurkat de las variantes de IgG1-huCD3 H1L1 (SEQ ID NO: 6 y 10, respectivamente), H1L2 (SEQ ID NO: 6 y 11, respectivamente), H1L3 (SEQ ID NO: 6 y 12), H3L3 (SEQ ID NO: 8 y 12, respectivamente) y H4L1 (SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente) con la región Fc de tipo silvestre e IgG1-CD3 precursora e IgG1-huCD3-H3L1 con mutaciones LFLEDA fueron similares. La unión de IgG1-huCLB-3/4, 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 IgG1-b12 de control negativo. H1 se refiere a la región variable de cadena pesada VH1, V1 se refiere a la región variable de cadena ligera VL1, y así sucesivamente.

La **Figura 11B** muestra que las variantes de anticuerpos biespecíficos de 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 mono-específicos. Las concentraciones de CE50 de los anticuerpos biespecíficos fueron de 6 a 10 veces mayores. De nuevo, no se observó unión para el anticuerpo de IgG1-b12 de control negativo.

La **Figura 12A** muestra que la unión de las variantes de IgG1-huCD3 H1L1, H1L2, H1L3, H3L3 y H4L1 (como se describió anteriormente) con la región Fc de tipo silvestre y las IgG1-CD3 precursora e IgG1-huCD3-H3L1 con mutaciones LFLEDA a la línea celular de linfocitos T de macaco cangrejero HSC-F fue similar. No se observó unión para huCLB-3/4, que no reacciona de forma cruzada con CD3 de macaco cangrejero, y el anticuerpo de IgG1-b12 de

control negativo.

La **Figura 12B** muestra que las variantes de anticuerpos biespecíficos de bsIgG1 CD3 x HER2 y bsIgG1 huCD3-H3L1 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 monoespecíficas anti-CD3. Las concentraciones de CE50 de los anticuerpos biespecíficos fueron de 10 a 12 veces mayores que las de los anticuerpos monoespecíficos anti-CD3. De nuevo, no se observó unión para el anticuerpo de IgG1-b12 de control negativo.

10 **Ejemplo 11 - Activación de linfocitos T mediante variantes de anticuerpos de CD3 humanizados**

La expresión de CD69 en linfocitos T se evaluó mediante análisis FACS para determinar la activación temprana de linfocitos T después de la incubación con variantes de anticuerpos de CD3 humanizados (huCD3) con y sin mutaciones LFLEDA en la región Fc. Además de las mutaciones no activadoras, las variantes del anticuerpo LFLEDA comprenden mutaciones F405L o K409R como se describe en el Ejemplo 10.

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

Se preparó una serie de respuesta a la dosis de variantes de anticuerpos de huCD3, un control negativo (IgG1-b12) y controles positivos (IgE-huCD3 e IgG1-CD3 precursora) en medio de cultivo (con un intervalo de 0,1 a 1.000 ng/ml en diluciones de 10 veces) y se añadió a los pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos que contenía PBMC humanas o de macaco cangrejero. Después de 16-24 horas de incubación, las células se sedimentaron mediante centrifugación y el sobrenadante (que contenía citocinas) se recogió y almacenó a -20 °C. Luego, las células se lavaron con PBS/BSA al 0,1 %/azida al 0,02 % y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con un anticuerpo de ratón anti-CD28-PE humano (854.222.010; Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos; marcador de linfocitos T) y anticuerpo de ratón anti-CD69-APC humano (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 CD28 positivas en FACS Canto II (BD Biosciences).

La **Figura 13** muestra que las variantes de IgG1-CD3 precursora e IgG1-huCD3 humanizada con región Fc de tipo silvestre indujeron niveles similares de expresión de CD69 en linfocitos T de origen humano (**Figura 13A**) y de macaco cangrejero (**Figura 13B**). Las variantes de IgG1-CD3 precursora e IgG1-huCD3-H3L1 no activadoras (LFLEDA) indujeron niveles bajos de expresión de CD69 en linfocitos T humanos. No se indujo expresión de CD69 por las variantes de IgG1-huCD3 no activadoras en linfocitos T de macaco cangrejero. El anticuerpo de control de IgG1-b12 tampoco indujo expresión de CD69 en linfocitos T humanos o de macaco cangrejero.

40 **Ejemplo 12 - Proliferación de linfocitos T inducida por variantes de anticuerpos de CD3 humanizados.**

El efecto de las variantes de anticuerpos de CD3 humanizados (huCD3) (descrito en los Ejemplos 1 y 10) sobre la proliferación de linfocitos T humanos y de macaco cangrejero se evaluó mediante el kit ELISA de proliferación celular de Roche Applied Science (Cell Proliferation ELISA, BrdU kit, n.º 11647229001; Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), que se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se incubaron PBMC humanas o de macaco cangrejero, aisladas de sangre completa o capa leucocitaria, en placas de cultivo de 96 pocillos con series de dilución (que varían de 0,1 a 1.000 ng/ml en diluciones de 10 veces) de variantes de anticuerpos de 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 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 ELISA.

La incorporación de BrdU en el ADN se determinó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, véase el número de catálogo especificado anteriormente). Las células se fijaron a las placas, donde después se incubaron las placas durante 90 minutos a TA con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. Las placas se lavaron con PBST y la unión se detectó usando tampón ABTS (en lugar de la solución 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. La DO405 nm se midió luego en un lector ELISA EL808.

La **Figura 14** muestra que la incubación de PBMC con variantes de IgG1-CD3 precursora y IgG1-huCD3 humanizada con la región Fc de tipo silvestre indujo una fuerte proliferación de linfocitos T humanos (**Figura 14A**) y de macaco cangrejero (**Figura 14B**), incluso a concentraciones muy bajas de anticuerpo. La incubación con variantes no activadoras LFLEDA de los anticuerpos de IgG1-huCD3 no indujo la proliferación de linfocitos T humanos o de macaco cangrejero. Por lo tanto, aunque las variantes no activadoras de los anticuerpos de IgG1-huCD3 indujeron bajos niveles de expresión de CD69 en linfocitos T humanos (como se muestra en el Ejemplo 11),

estas variantes de IgG1-huCD3 no activadoras no indujeron la proliferación de linfocitos T humanos.

Ejemplo 13 - Citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* inducida por variantes de anticuerpos de CD3 humanizados

5 Se cultivaron células AU565 (carcinoma de mama humano) en RPMI 1640 complementado con CCS inactivado por calor al 10 % (vol/vol), bicarbonato de sodio 1,5 g/l (Lonza), piruvato de sodio 1 mM, glucosa 4,5 g/l (Sigma), penicilina 50 UI/ml y estreptomina 50 µg/ml. La línea celular se mantuvo a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % (vol/vol). Las células AU565 se cultivaron hasta casi la confluencia, después de lo cual las células se
10 tripsinizaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de un filtro celular para obtener una suspensión celular única. Se sembraron 5x10⁴ células en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos, y las células se incubaron al menos 3 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % para permitir la adherencia a la placa.

15 Se aislaron PBMC humanas o de macaco cangrejero de sangre completa o 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 linfocitos T presentes en las PBMC se midió mediante análisis FACS, usando un anticuerpo de ratón anti-CD3-PerCP humano (BD, n.º 345766) (para teñir linfocitos T). El contenido de linfocitos T en la población de PBMC usadas fue normalmente de un 50 a un 60 %.

20 Se prepararon series de dilución (concentraciones finales que varían de 0,001 a 1.000 ng/ml) de variantes de anticuerpos biespecíficos de bslgG1 CD3 x HER2, bslgG1 CD3 x b12-LFLEDA y bslgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA en medio de cultivo y se añadieron a las placas. IgG1-HER2-LFLEDA e IgG1-b12 se incluyeron como
25 controles. Además de las mutaciones no activadoras, las variantes del anticuerpo LFLEDA comprenden mutaciones F405L o K409R para la preparación en formato biespecífico (véase el Ejemplo 10). Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C, CO₂ al 5 %. La incubación de células con estaurosporina 1 µM (N.º S6942-200, Sigma) se usó como referencia para el 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 de Alamar al 10 % a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se midió la absorbancia a 590 nm (Envision, Perkin Elmer, Waltham, MA). Las
30 variantes de anticuerpos biespecíficos de CD3xHER2-LFLEDA (variante H3L1 precursora y humanizada) indujeron la destrucción de células AU565 a bajas concentraciones usando células efectoras humanas o de macaco cangrejero (**Figura 15**). El anticuerpo biespecífico de CD3 huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA, que no muestra reactividad cruzada con CD3 de macaco cangrejero, solo indujo la destrucción de células AU565 cuando se usaron PBMC humanas (**Figura 15A**). Por lo tanto, no se observó destrucción de células diana cuando se usaron células efectoras de macaco cangrejero en el ensayo (**Figura 15B**). La incubación con anticuerpos monoespecíficos de IgG1-b12 o IgG1-HER2-LFLEDA o biespecíficos de CD3xb12-LFLEDA no indujo la destrucción inespecífica de células diana
35 (**Figura 15**).

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Genmab B.V.

<120> Formato inerte

<130> P/0079-WO

45 <160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 1

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
1 5

60 <210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65 <400> 2

ES 2 792 199 T3

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

5 <210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

10 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

15 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

25 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

30 <210> 6
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 6

ES 2 792 199 T3

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*

5

<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

10

ES 2 792 199 T3

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*

5

<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

10

<210> 9
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 9

ES 2 792 199 T3

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*

5

<400> 10

ES 2 792 199 T3

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*

5

<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

10

<210> 12
<211> 109

ES 2 792 199 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

5

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> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 13

ES 2 792 199 T3

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 792 199 T3

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

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 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> 14
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

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

10

ES 2 792 199 T3

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> 15
<211> 171
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

10

ES 2 792 199 T3

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
 100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
 115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
 130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
 145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 165 170

<210> 16
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

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

10

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 17

ES 2 792 199 T3

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> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

5

10

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

ES 2 792 199 T3

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

5 <210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

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

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

15 <210> 20
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

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

ES 2 792 199 T3

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

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

<210> 21
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<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

10

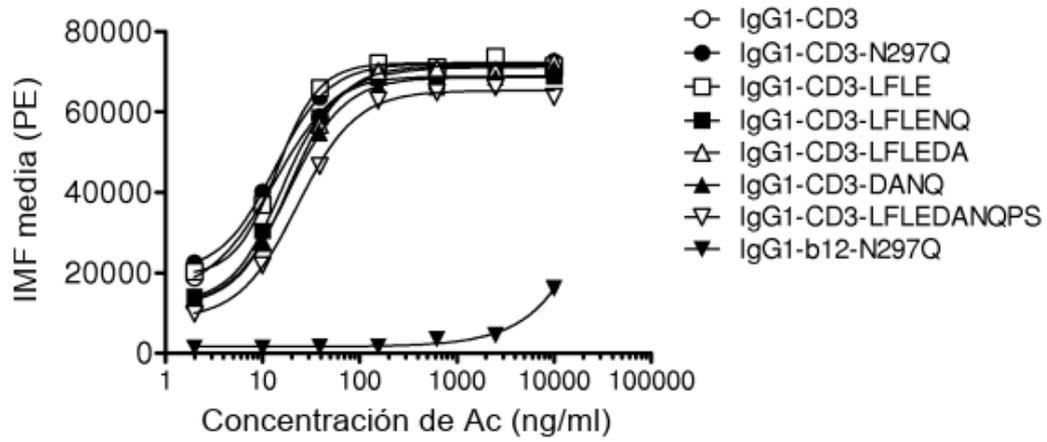
REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde dicho primer y segundo polipéptido comprende cada uno al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3 de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 humana, donde tanto en dicho primer como segundo polipéptido los aminoácidos en las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 de la cadena pesada de IgG1 humana, son F, E, A, N y P, respectivamente, donde las posiciones de aminoácidos están numeradas de acuerdo con el índice EU de numeración.
2. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína tiene una tasa de eliminación plasmática (ml/día/kg) que se desvía de una proteína de tipo silvestre en no más de un 10 %, tal como no más de un 8 %, no más de un 7 %, no más de un 5 %, no más de un 3 %, no más de un 1 % y no más de un 0 %, donde la tasa de eliminación plasmática se calcula por la dosis (pg/kg) administrada a un sujeto dividida por el área bajo la curva (ABC), donde el valor del ABC se determina a partir de curvas de concentración-tiempo,
- donde dicha proteína de tipo silvestre es idéntica a la proteína de la reivindicación 1, excepto que tanto en el primer como en el segundo polipéptido los aminoácidos en las posiciones L234, L235 y D265 de la cadena pesada de IgG1 humana, son L, L y D, respectivamente.
3. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos primer y segundo polipéptido son una primera y una segunda cadena pesada de una inmunoglobulina, respectivamente.
4. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos primer y segundo polipéptido comprenden además una primera y una segunda región de unión, respectivamente.
5. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína comprende una primera y una segunda cadena ligera de una inmunoglobulina, donde dicha primera cadena ligera está conectada con dicha primera cadena pesada a través de puentes disulfuro y dicha segunda cadena ligera está conectada con dicha segunda cadena pesada a través de puentes disulfuro.
6. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína comprende una primera y una segunda región de unión y al menos una de dichas primera y segunda regiones de unión se unen a CD3.
7. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína comprende una primera y una segunda región de unión y tanto dicha primera como segunda región de unión se unen a CD3.
8. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, media la expresión reducida de CD69 mediada por Fc en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 % cuando se compara con una proteína de tipo silvestre, cuando la expresión de CD69 se determina en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
9. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína, cuando está presente como un anticuerpo monoespecífico que se une a CD3, media la proliferación reducida de linfocitos T mediada por Fc en comparación con una proteína de tipo silvestre en al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % y un 100 %, cuando la proliferación de linfocitos T se mide en un ensayo funcional basado en PBMC.
10. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína comprende una primera región de unión seleccionada del grupo que consiste en:
- una región de unión que comprende la secuencia de región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 12;
 - una región de unión que comprende la secuencia de región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 8 y la secuencia de región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 12; y
 - una región de unión que comprende la secuencia de región variable de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de región variable de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 10.
11. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína comprende una primera y una segunda región de unión y dicha primera región de unión se une a una diana diferente que dicha segunda región de unión.
12. La proteína de acuerdo con la reivindicación 11, donde las dianas están presentes en diferentes células.
13. La proteína de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, donde la primera región de unión se une a CD3, y la segunda región de unión se une a una diana específica de cáncer.

14. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde en dicho primer polipéptido al menos uno de los aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en la cadena pesada de IgG1 humana se ha sustituido adicionalmente, y en dicho segundo polipéptido al menos uno de los aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 en la cadena pesada de IgG1 humana se ha sustituido adicionalmente, y donde dichas sustituciones de dichos primer y segundo polipéptidos no están en las mismas posiciones.
15. La proteína de acuerdo con la reivindicación 14, donde el aminoácido en la posición F405 en una cadena pesada de IgG1 humana es L en dicho primer polipéptido, y el aminoácido en la posición K409 en una cadena pesada de IgG1 humana es R en dicho segundo polipéptido, o viceversa.
16. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo.
17. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proteína es un anticuerpo biespecífico.
18. Una composición que comprende la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
19. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20. La proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, la composición de acuerdo con la reivindicación 18 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento de una enfermedad.
21. La proteína, composición o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde la enfermedad es cáncer, enfermedad infecciosa o enfermedad autoinmunitaria.

Figura 1

A



B

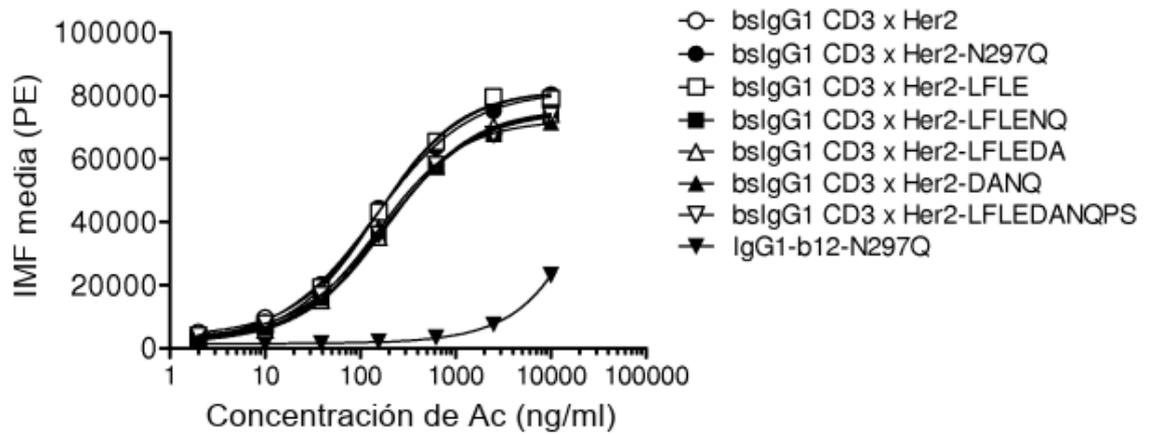
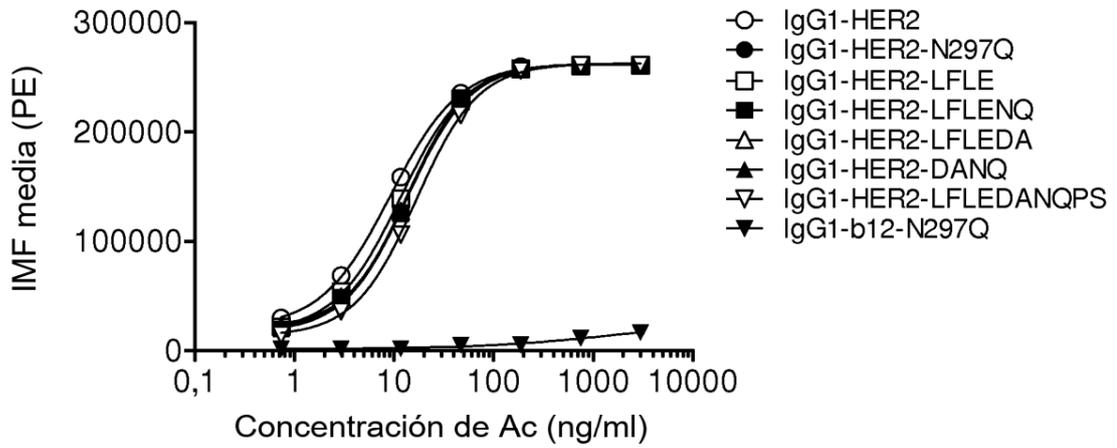


Figura 1 cont.

C



D

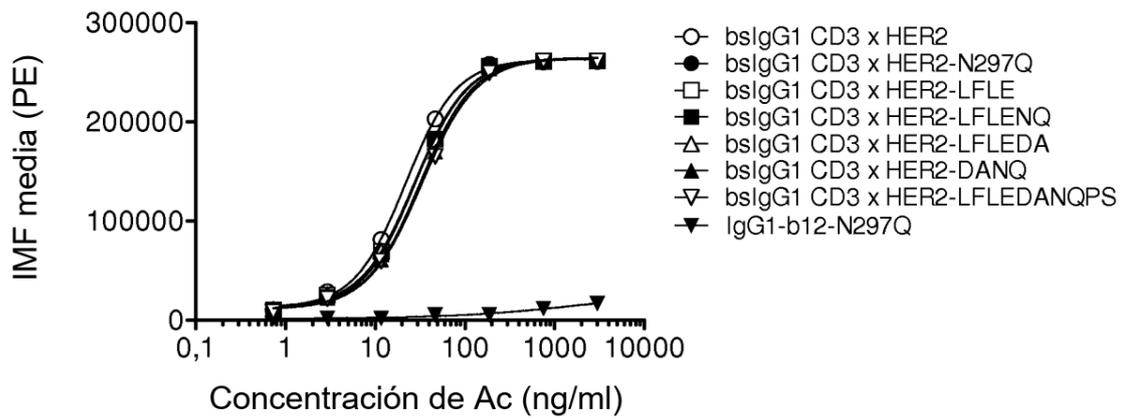
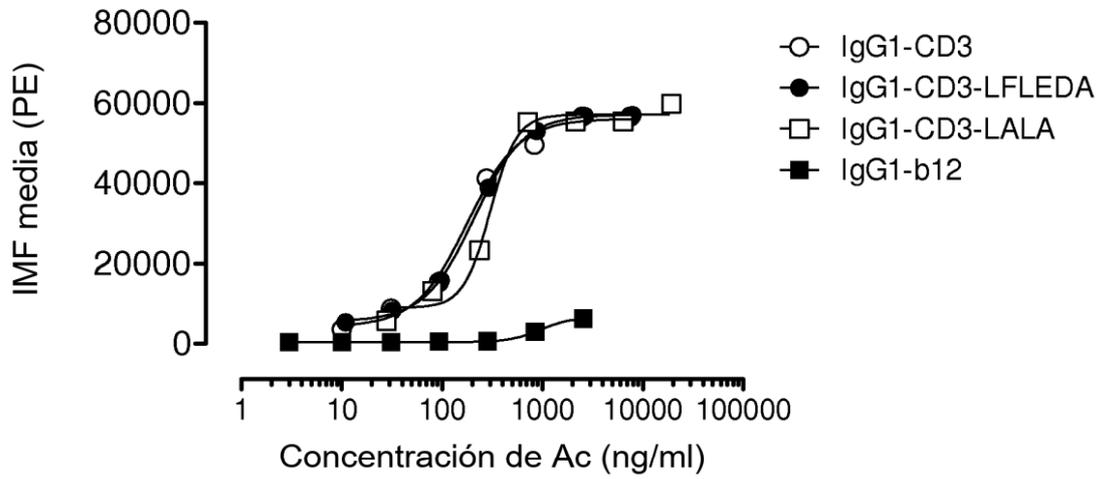


Figura 2

A



B

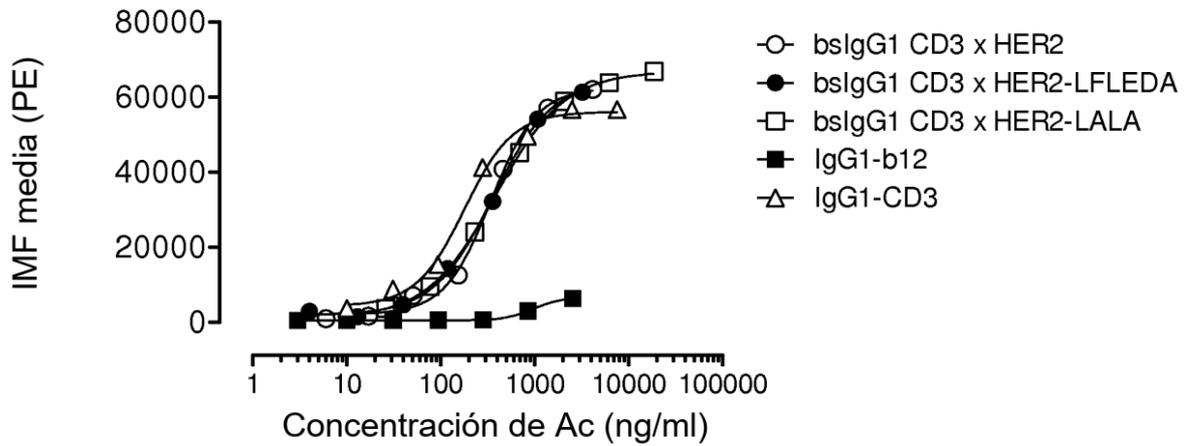
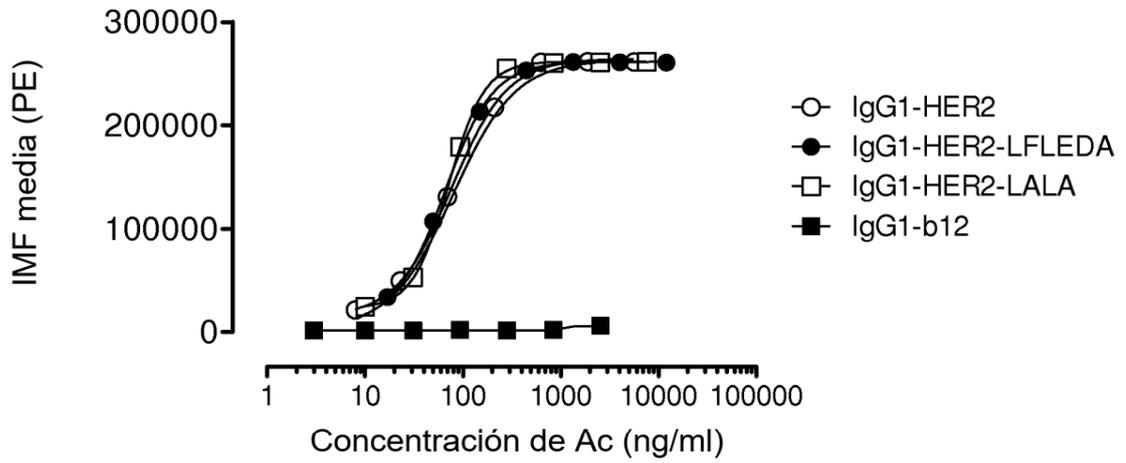


Figura 2 cont.

C



D

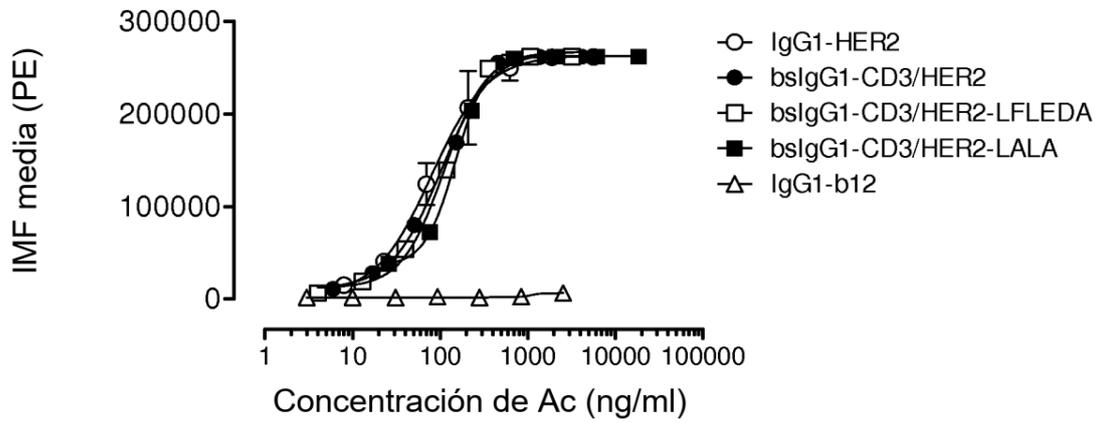
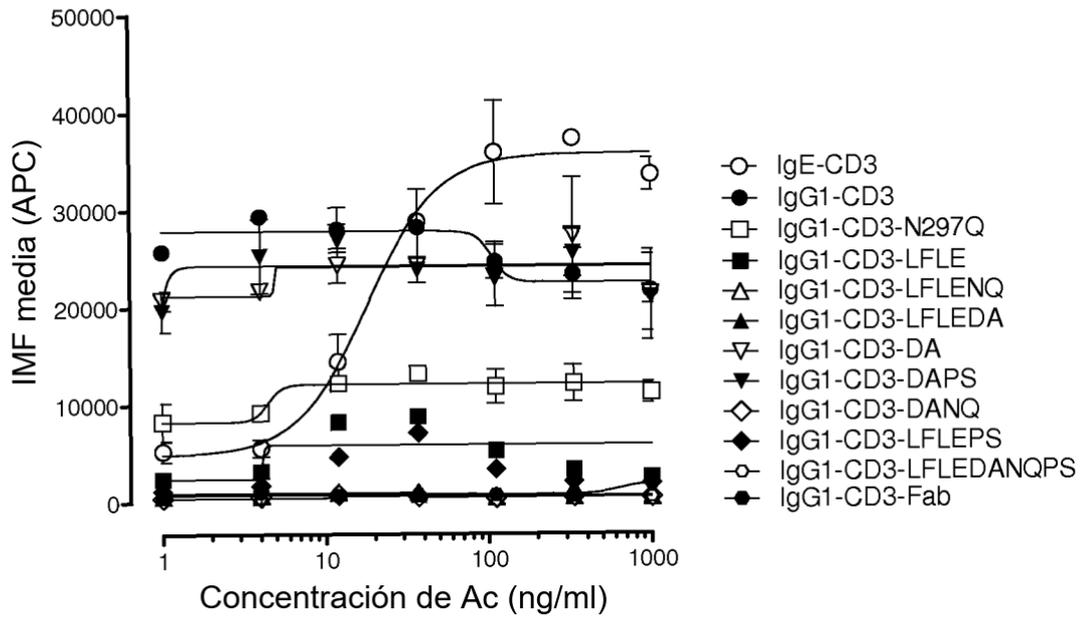


Figura 3

A



B

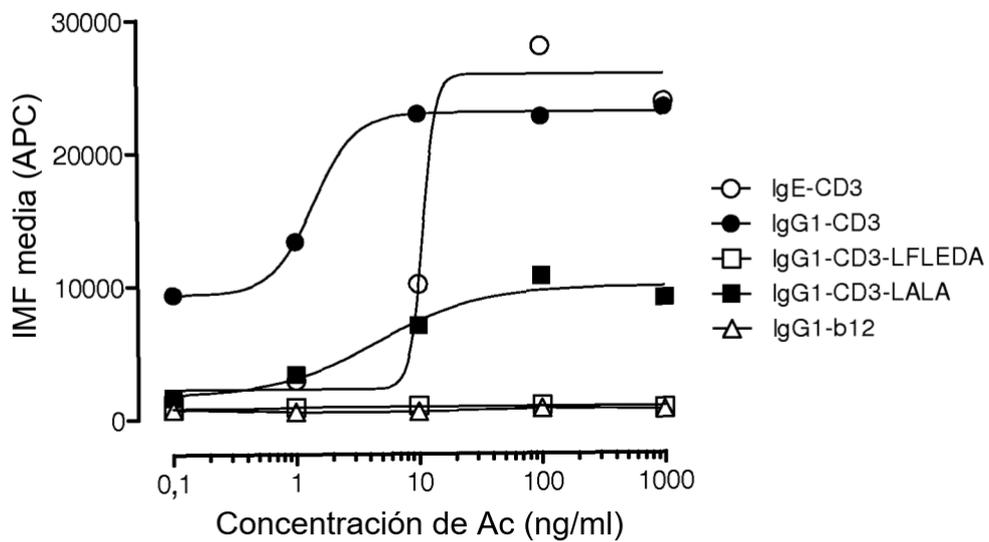
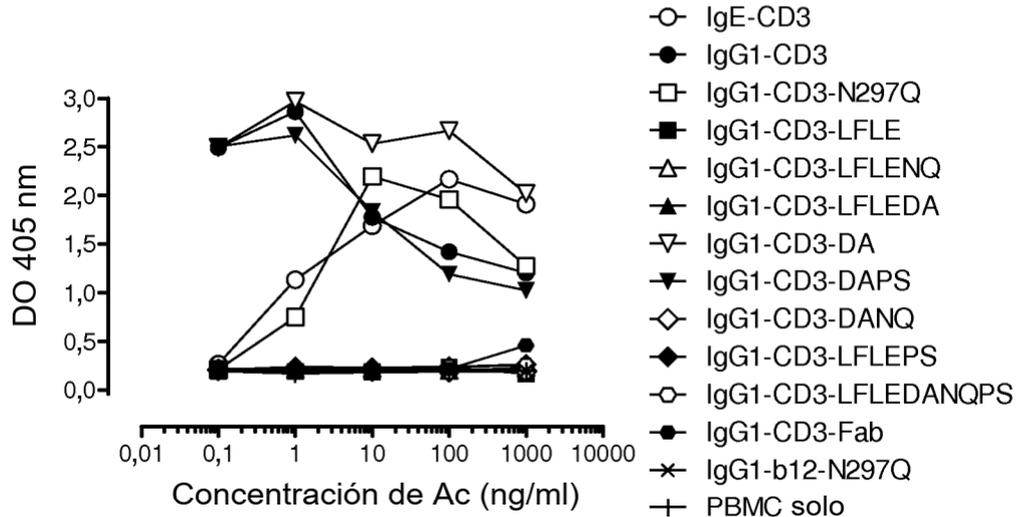


Figura 4

A



B

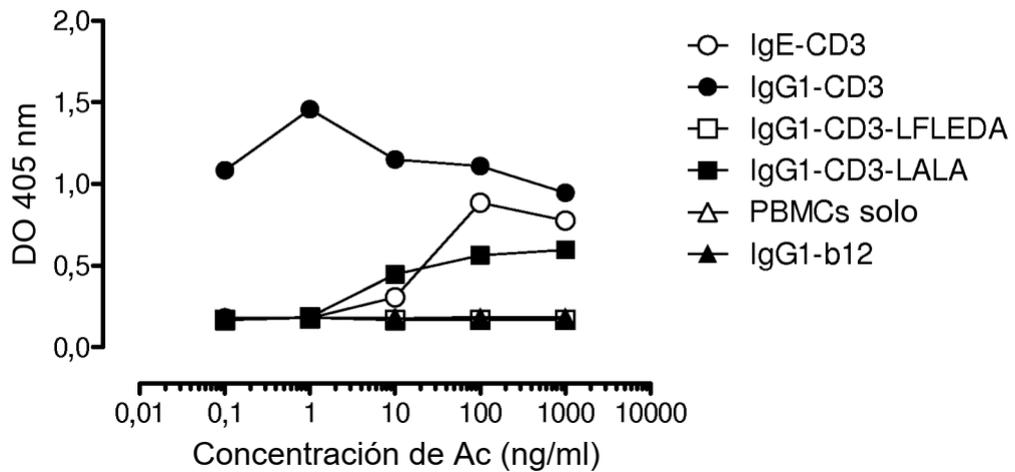
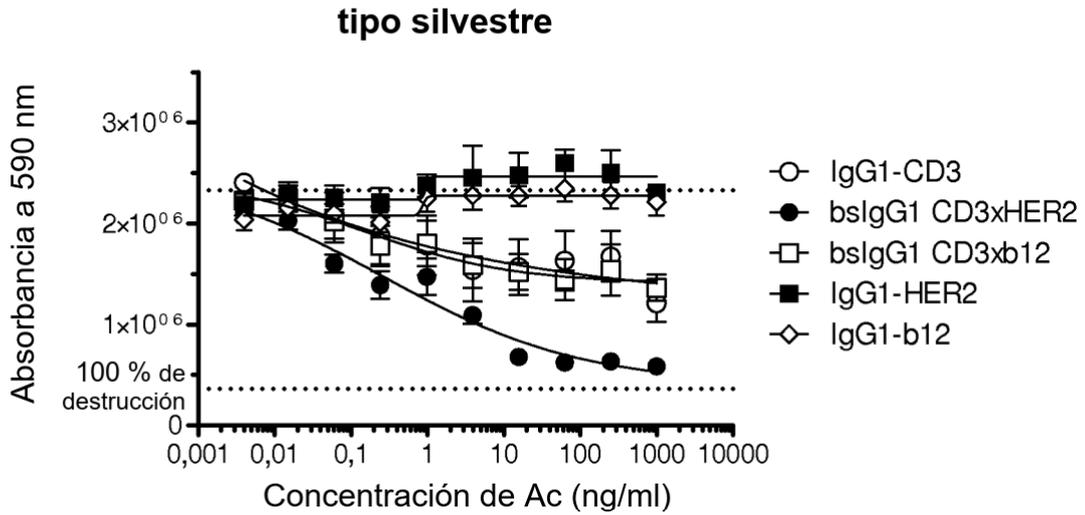


Figura 5

A



B

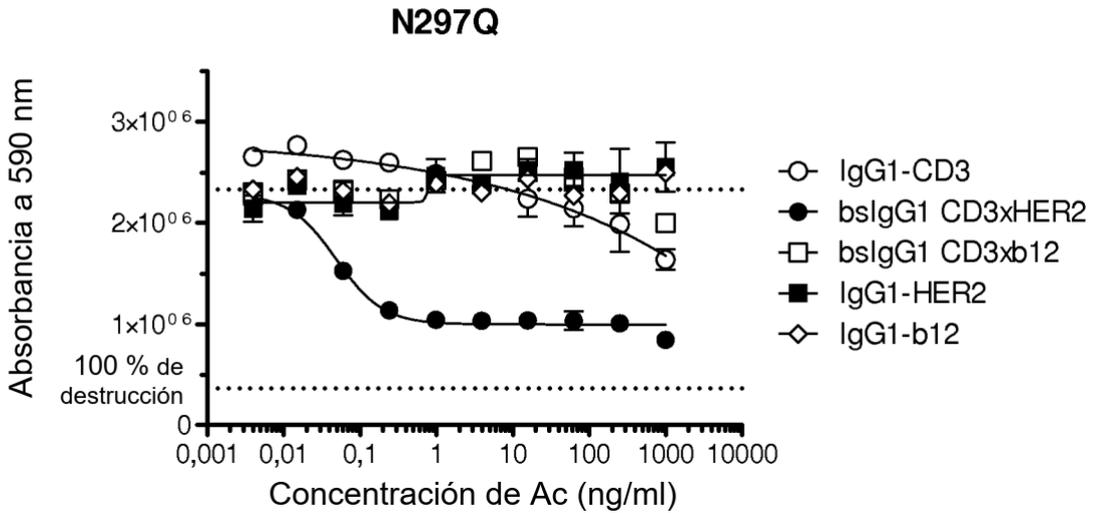
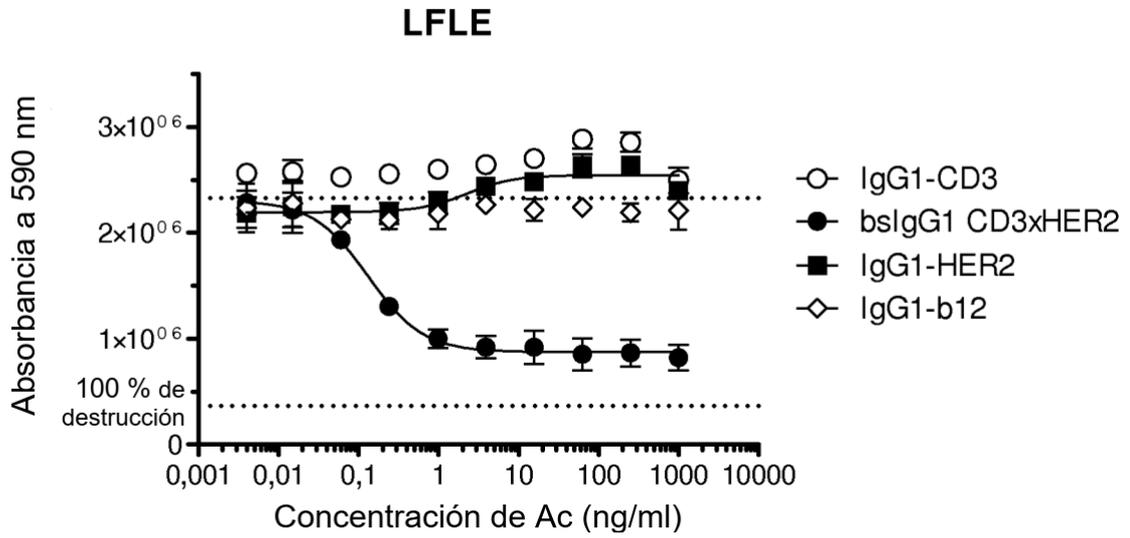


Figura 5 cont.

C



D

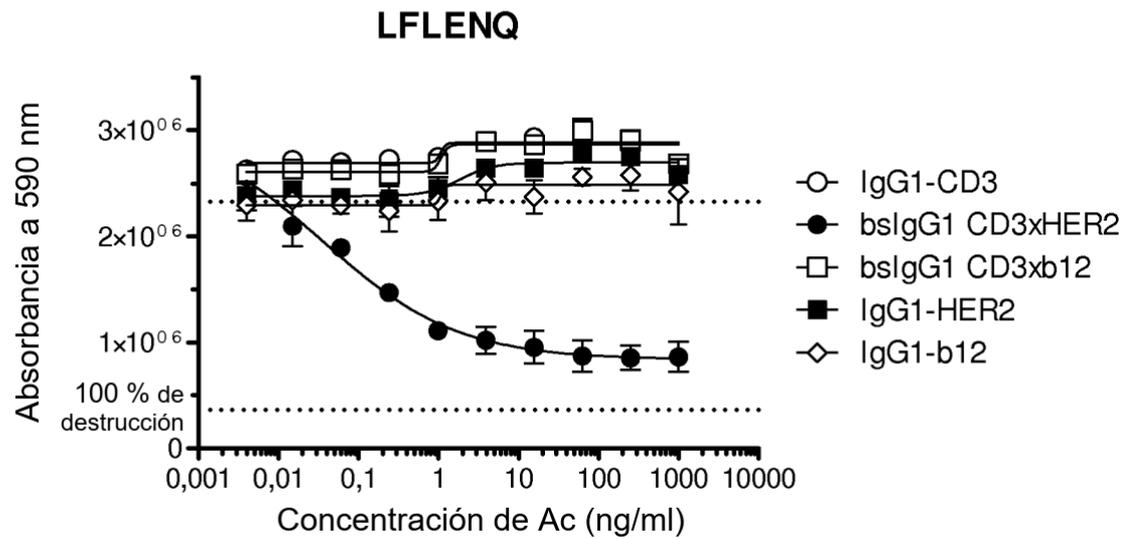
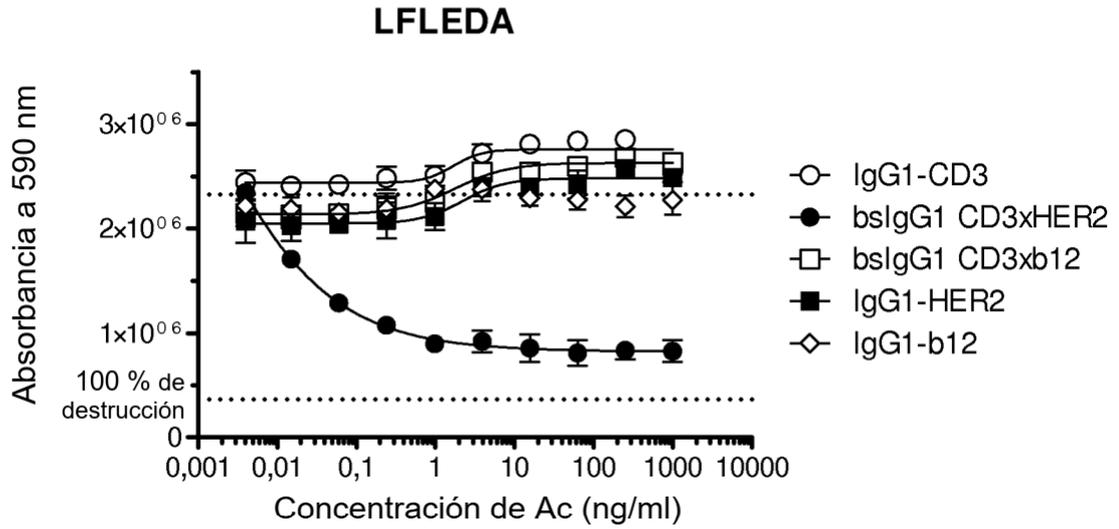


Figura 5 cont.

E



F

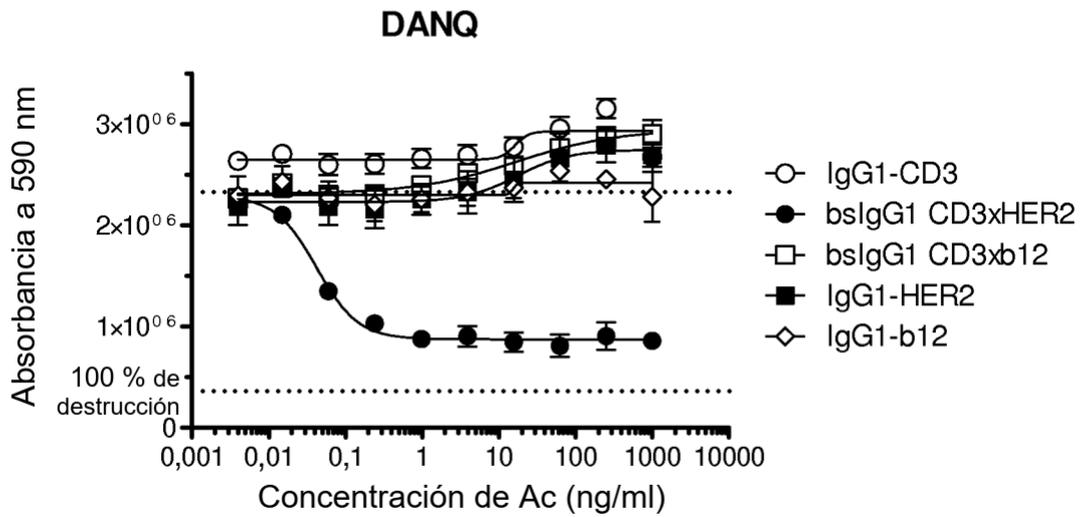


Figura 5 cont.

G

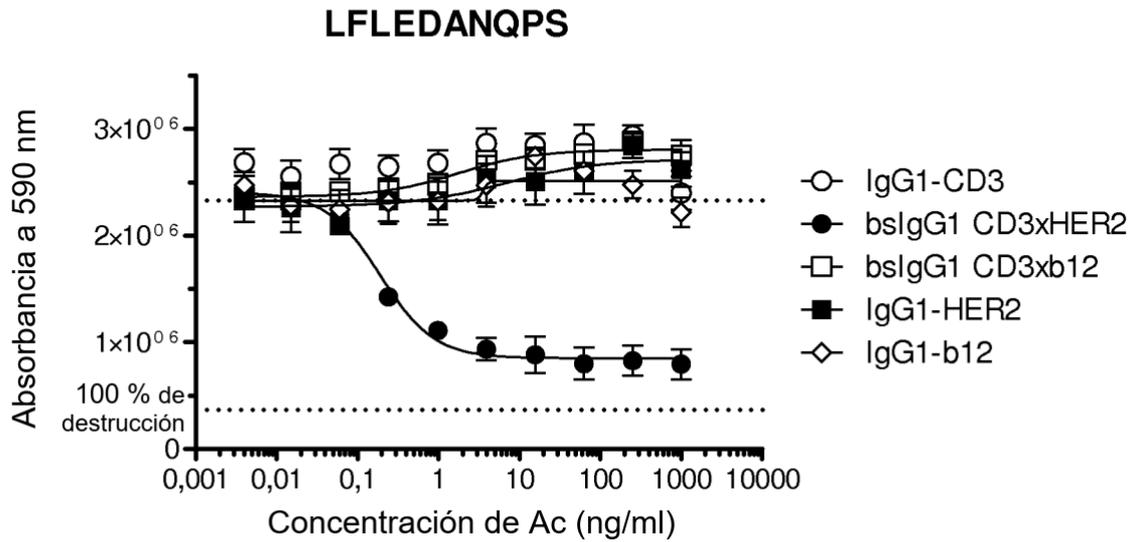


Figura 6

A

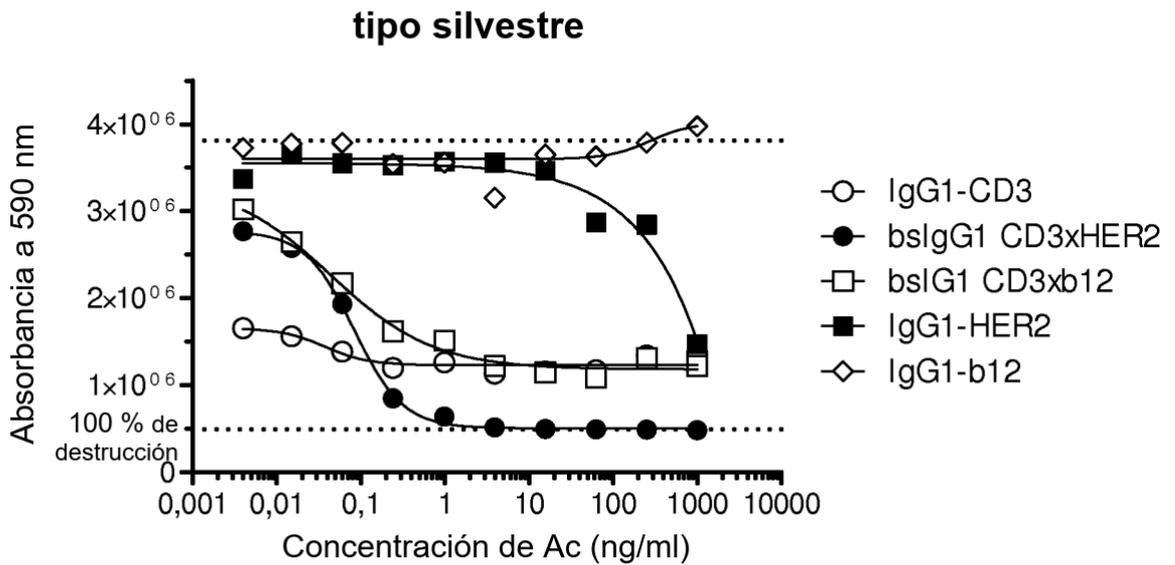
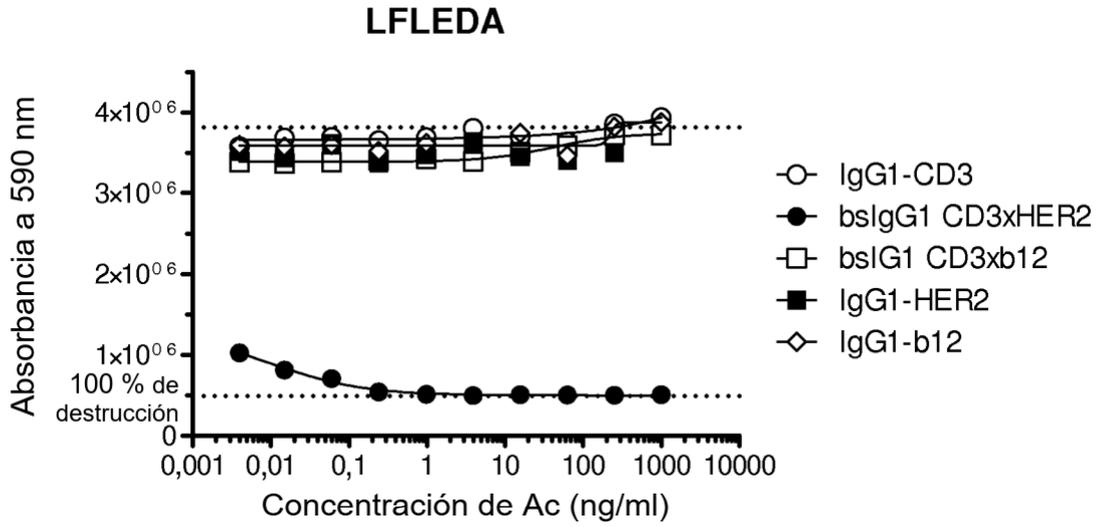


Figura 6 cont.

B



C

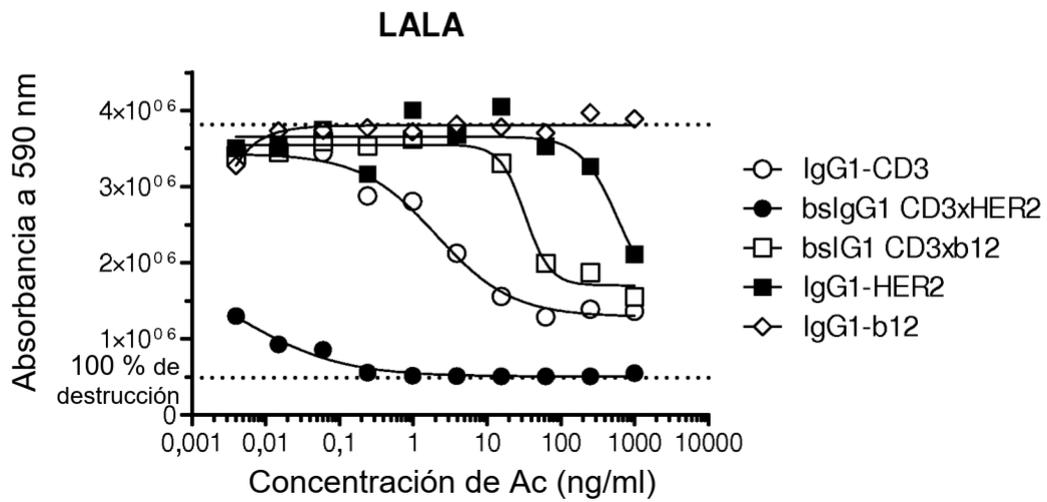
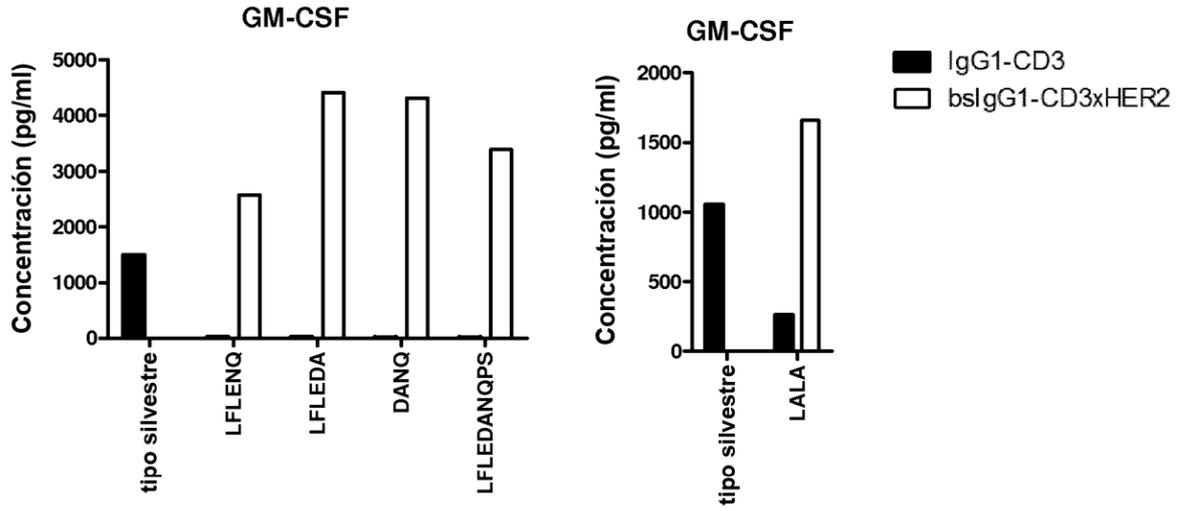


Figura 7

A



B

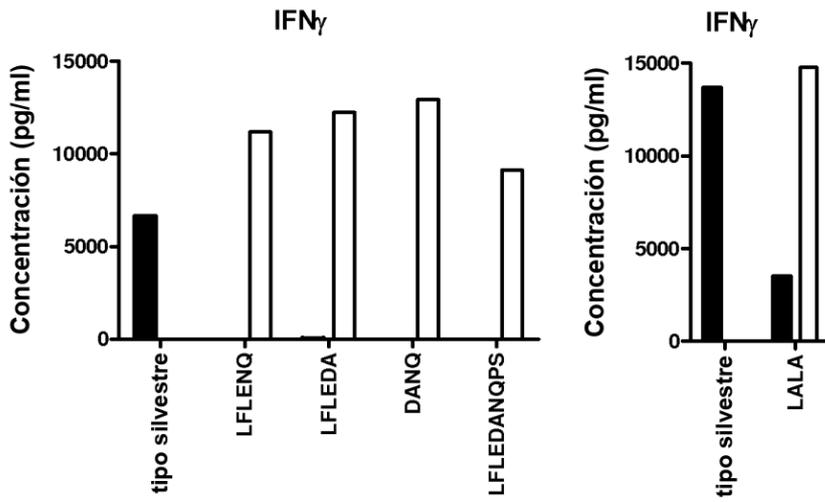
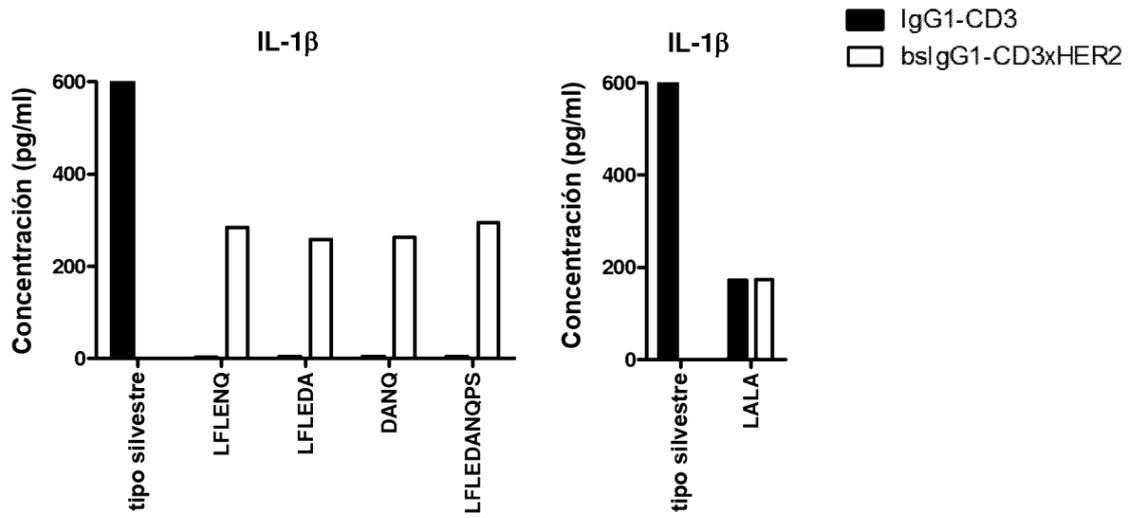


Figura 7 cont.

C



D

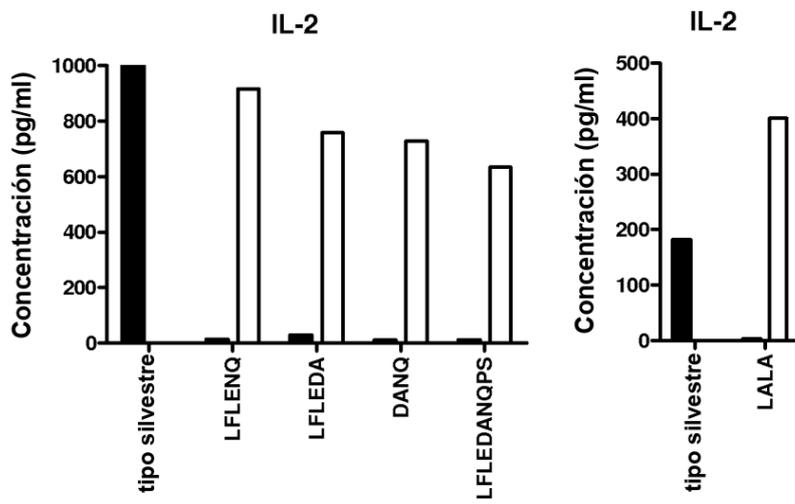
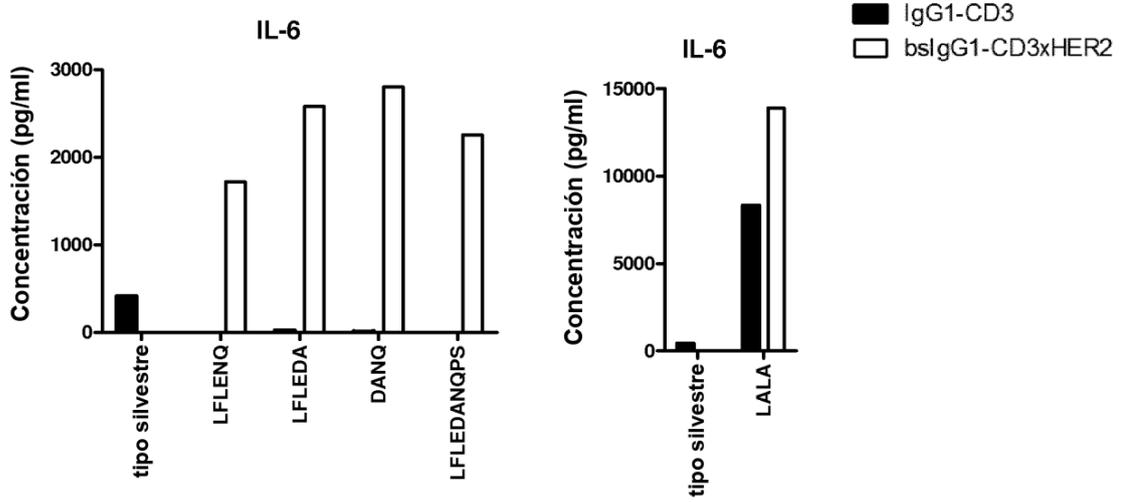


Figura 7 cont.

E



F

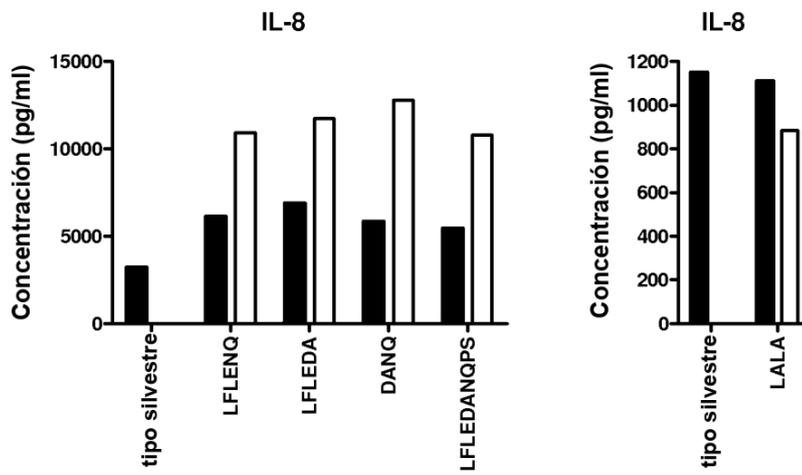
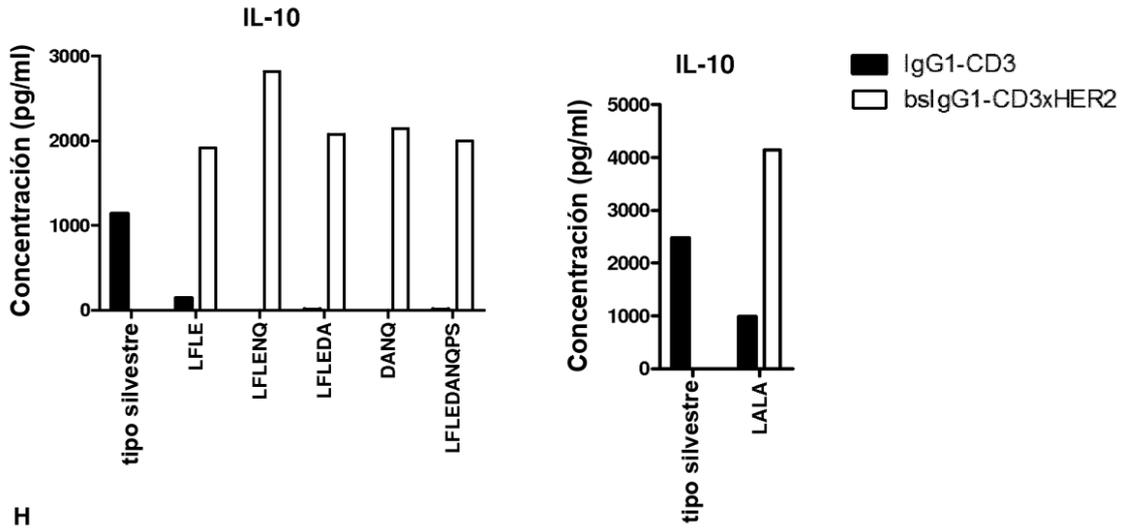
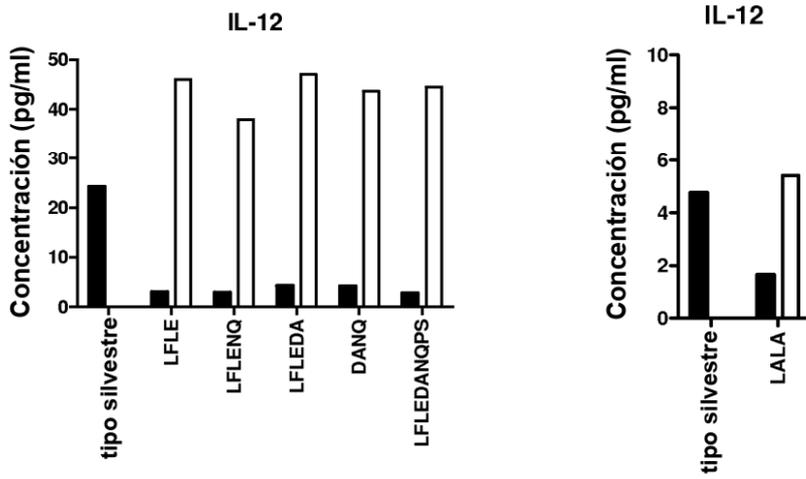


Figura 7 cont.

G



H



I

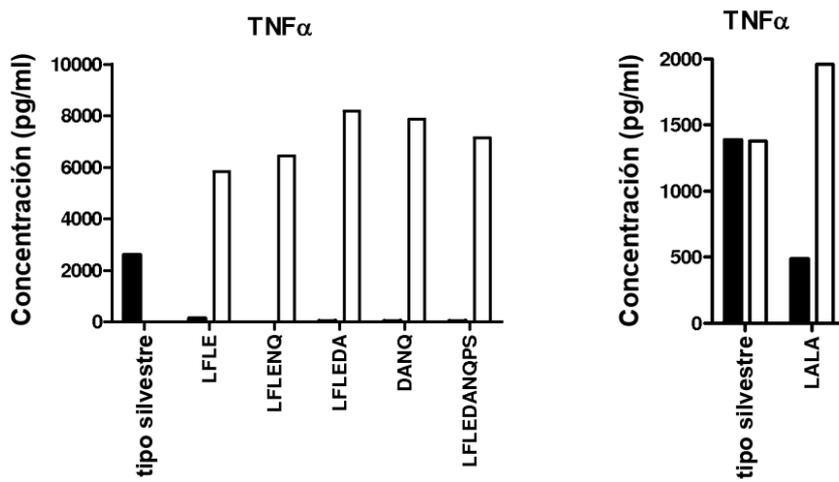
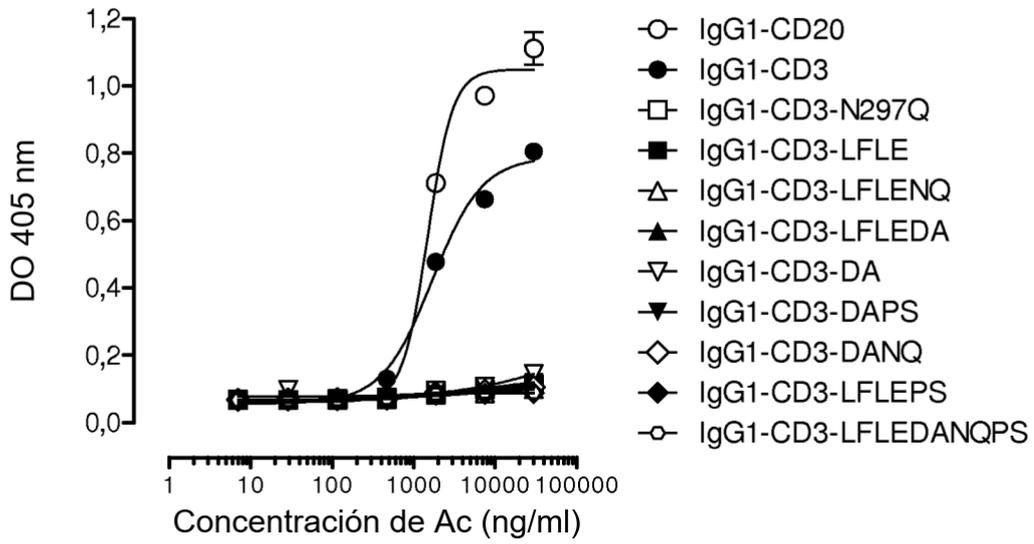


Figura 8

A



B

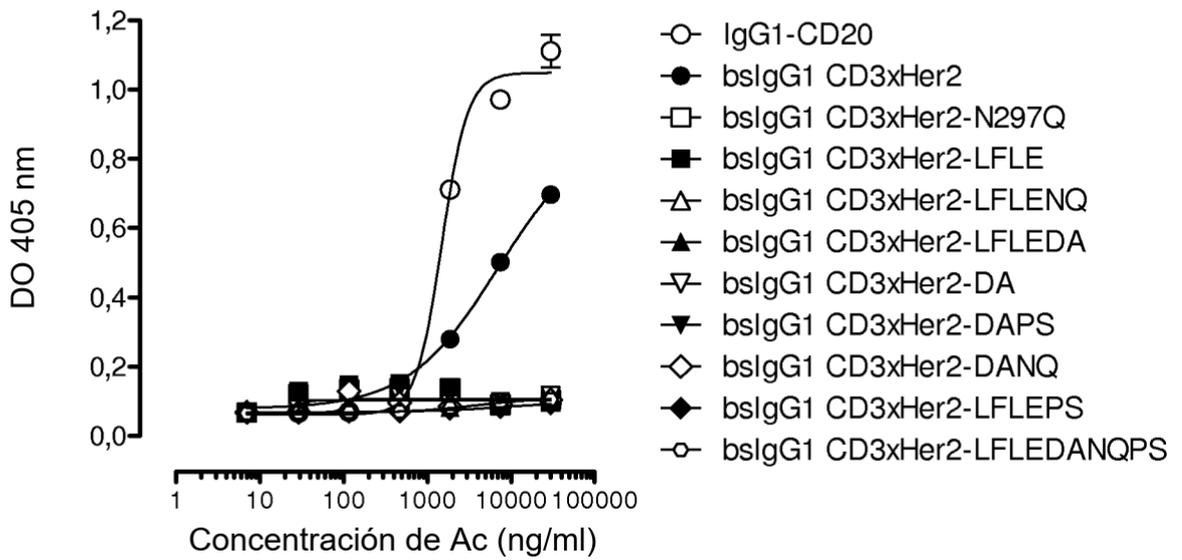
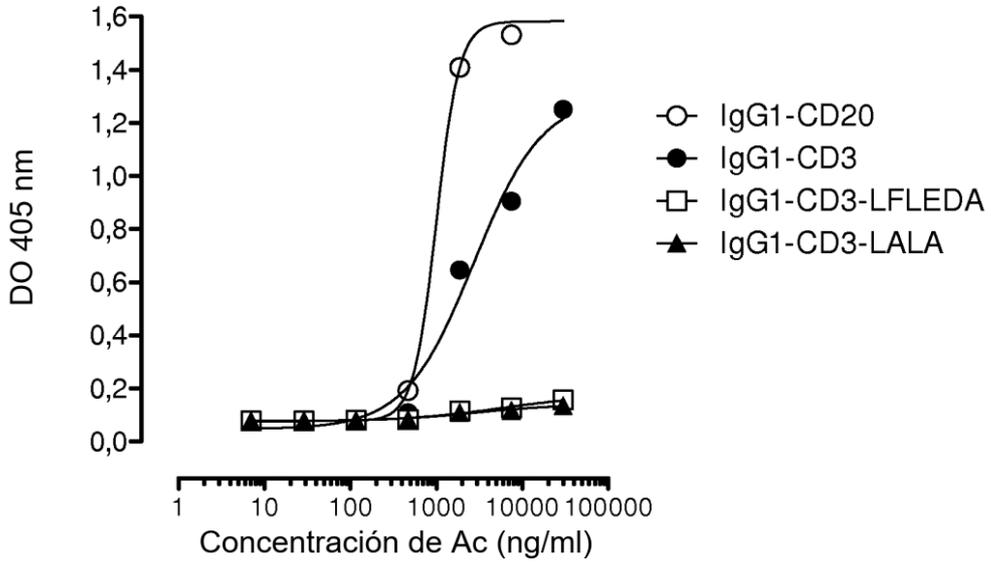


Figura 8 cont.

C



D

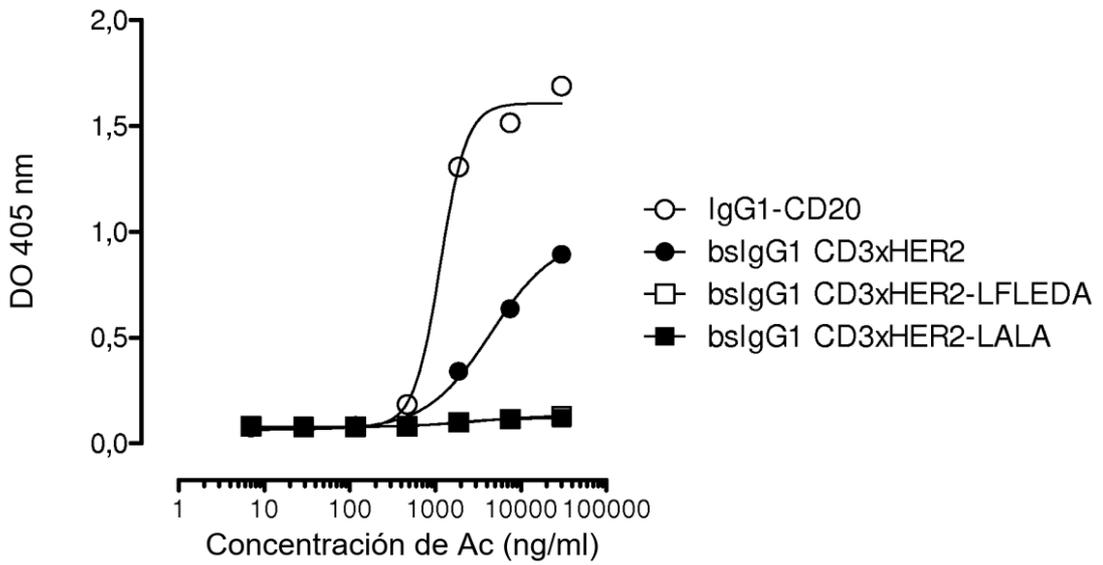
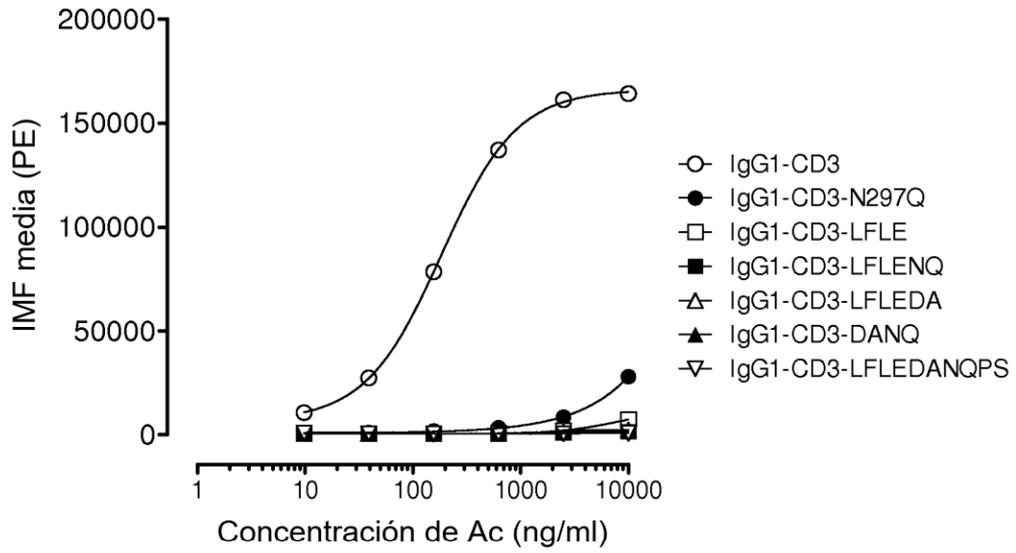


Figura 9

A



B

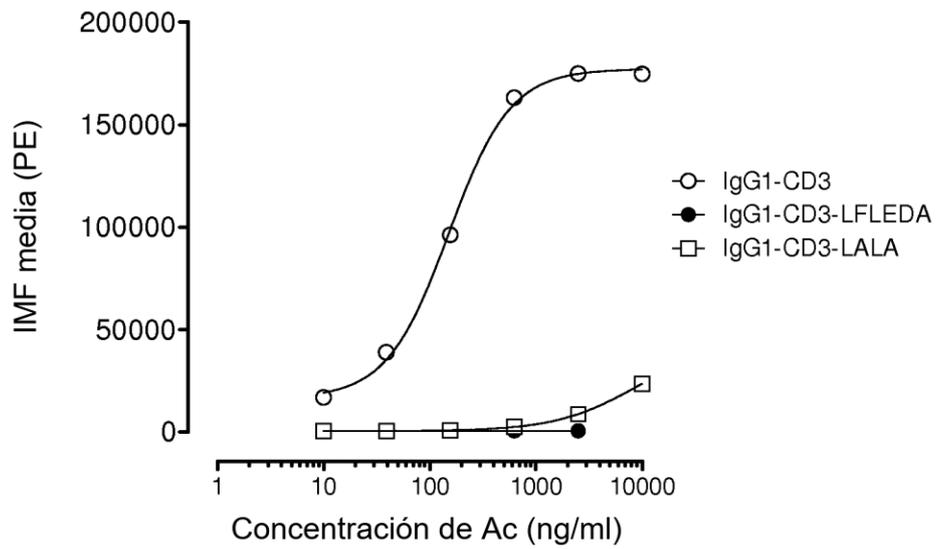
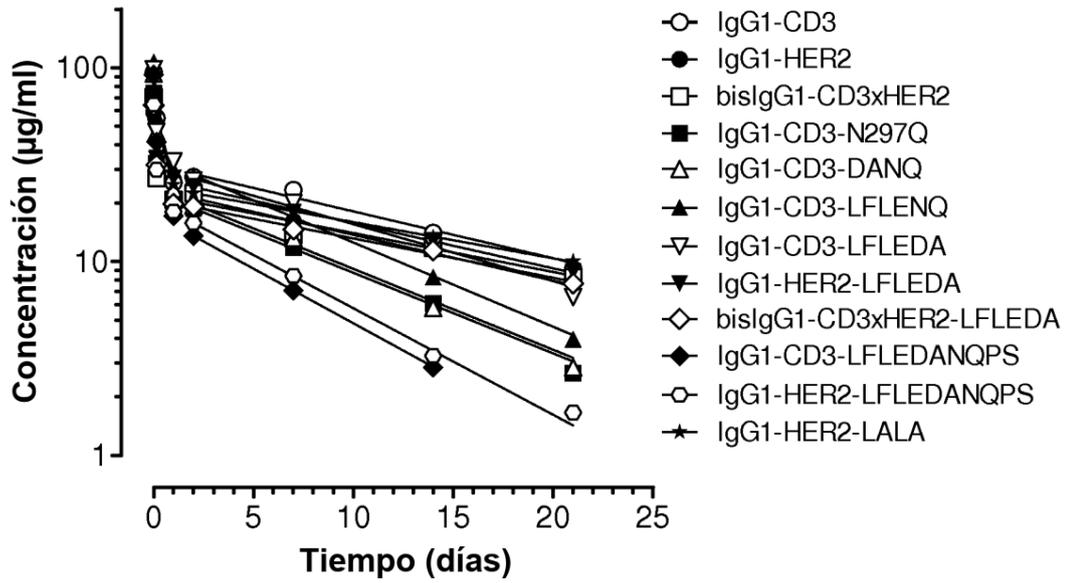


Figura 10

A



B

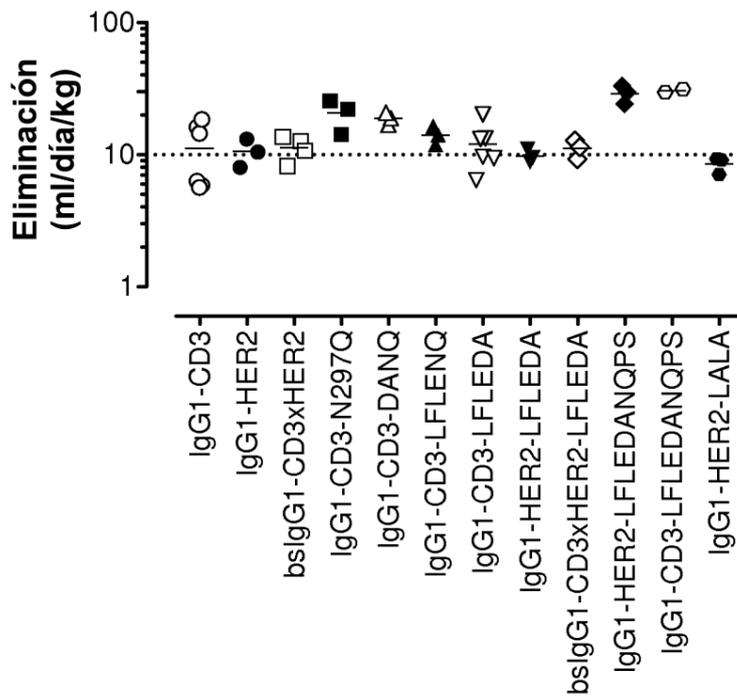
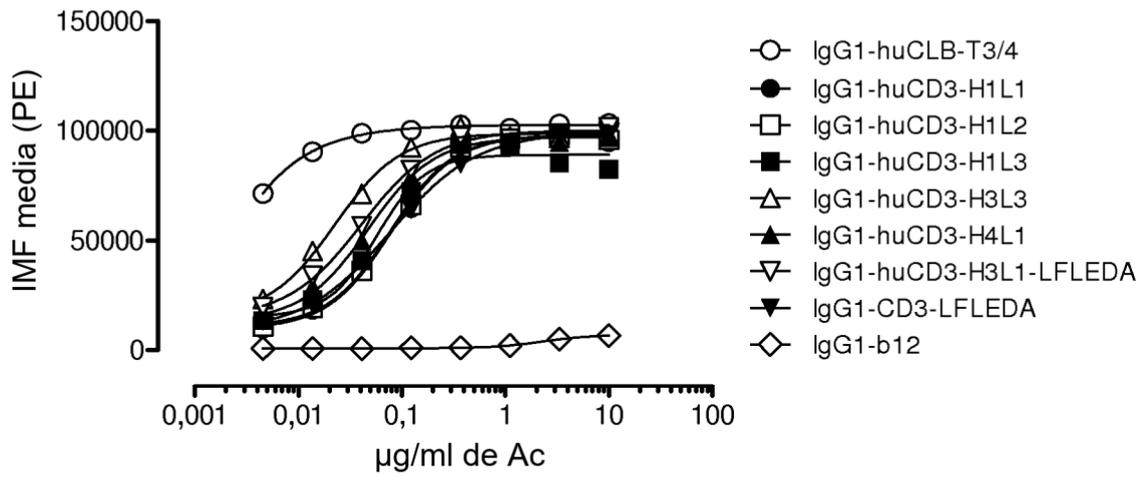


Figura 11

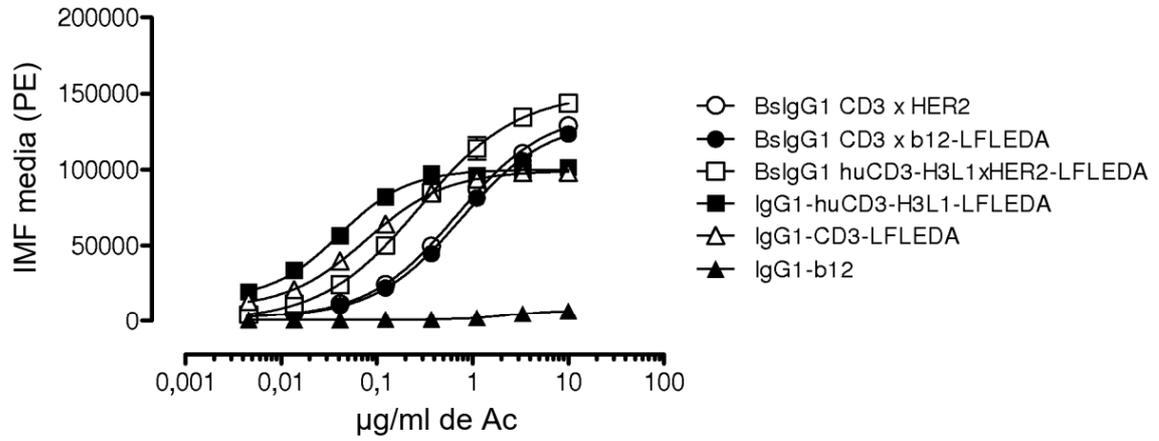
A



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

Figura 11 cont.

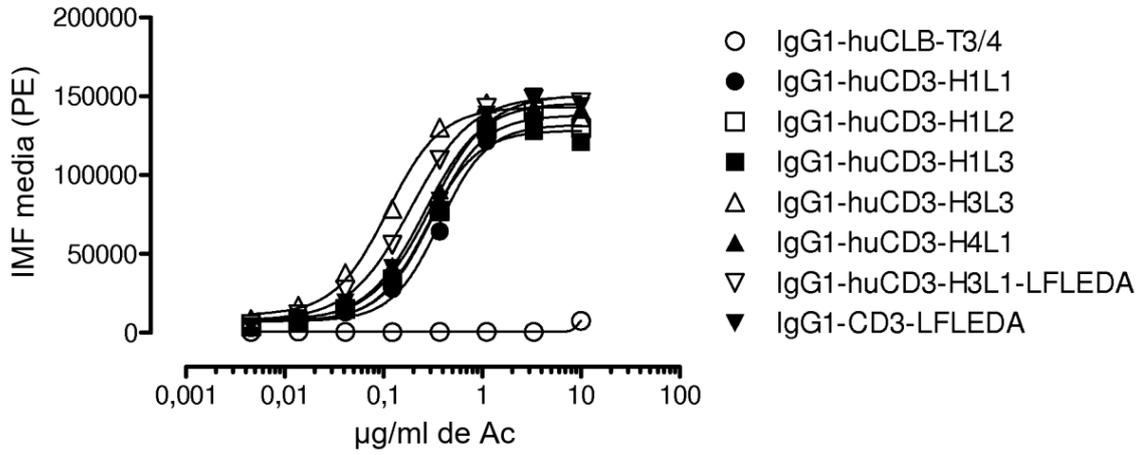
B



Anticuerpo	CE50 (µg/ml)
BslgG1 CD3 x HER2	0,68
BslgG1 CD3 x b12-LFLEDA	0,75
BslgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0,28
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0,04
IgG1-CD3-LFLEDA	0,07

Figura 12

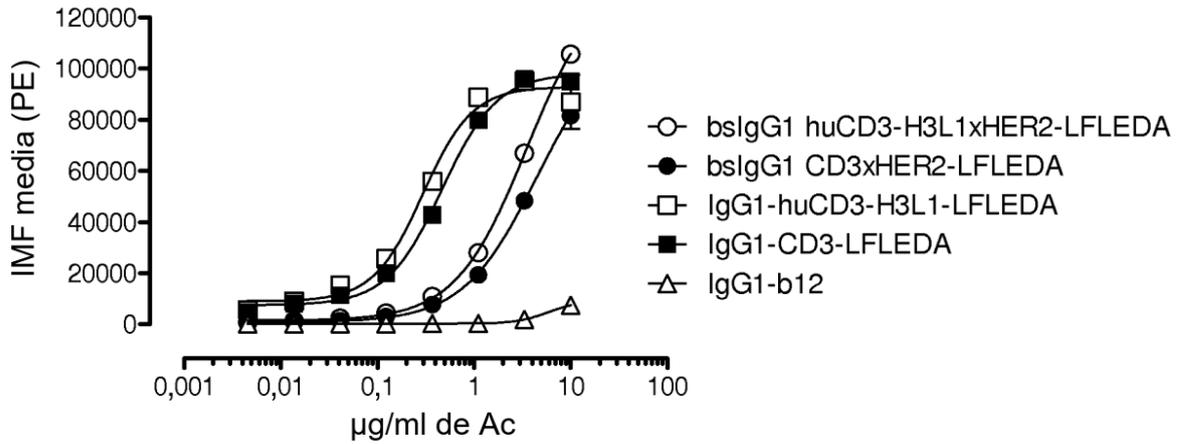
A



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

Figura 12 cont.

B



Anticuerpo	CE50 (µg/ml)
bslgG1 CD3xHER2-LFLEDA	4,46
bslgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	3,54
IgG1-CD3-LFLEDA	0,47
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0,30

Figura 13

A

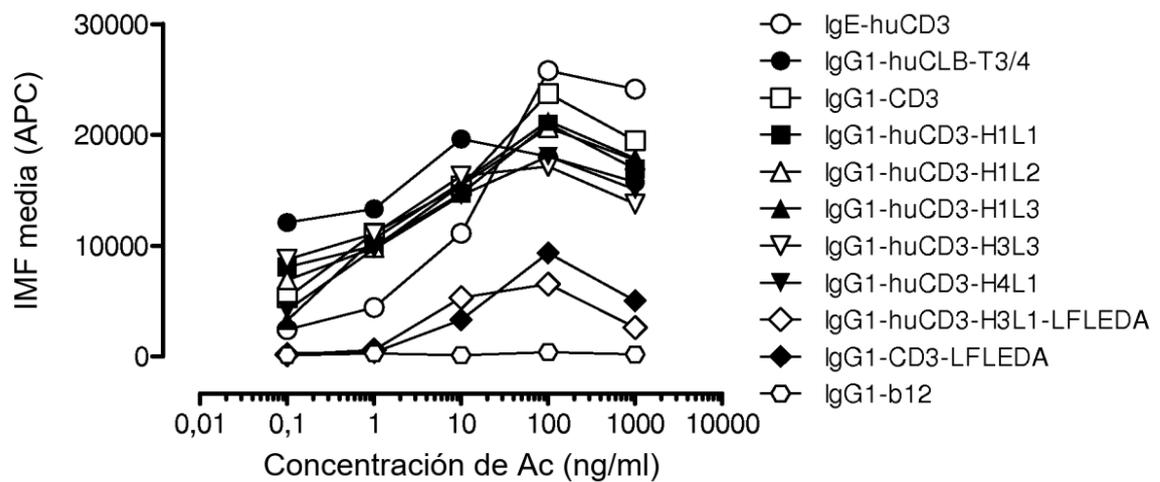


Figura 13 cont.

B

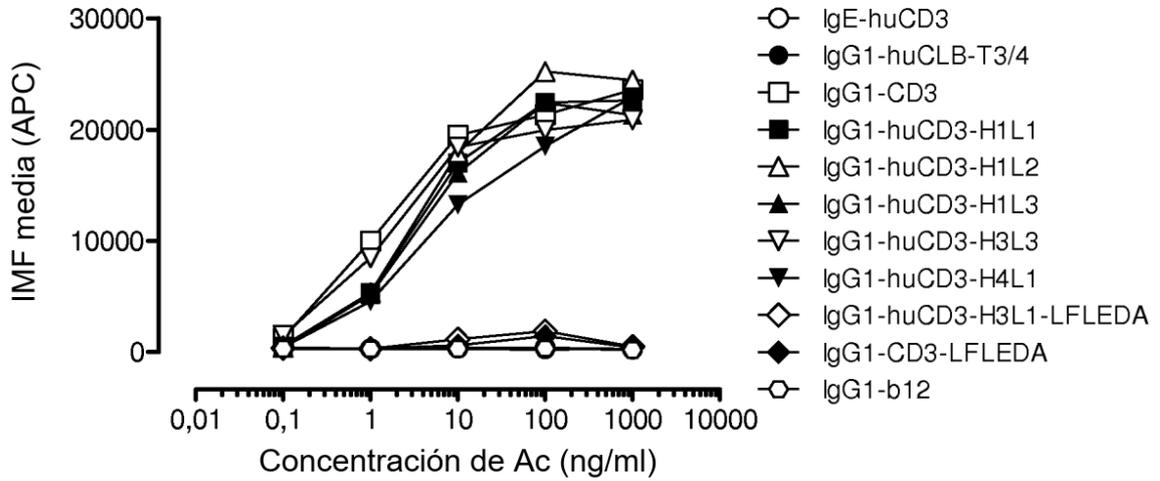


Figura 14

A

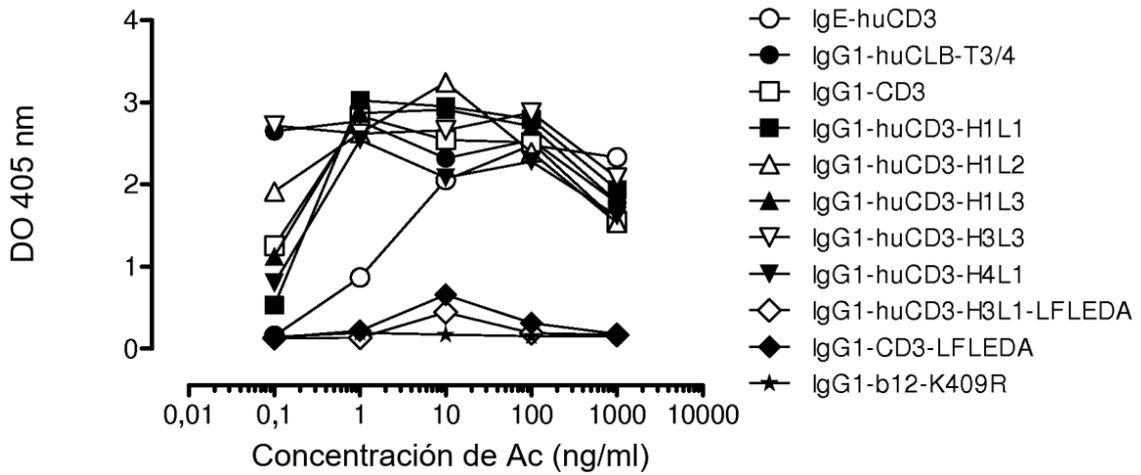


Figura 14 cont.

B

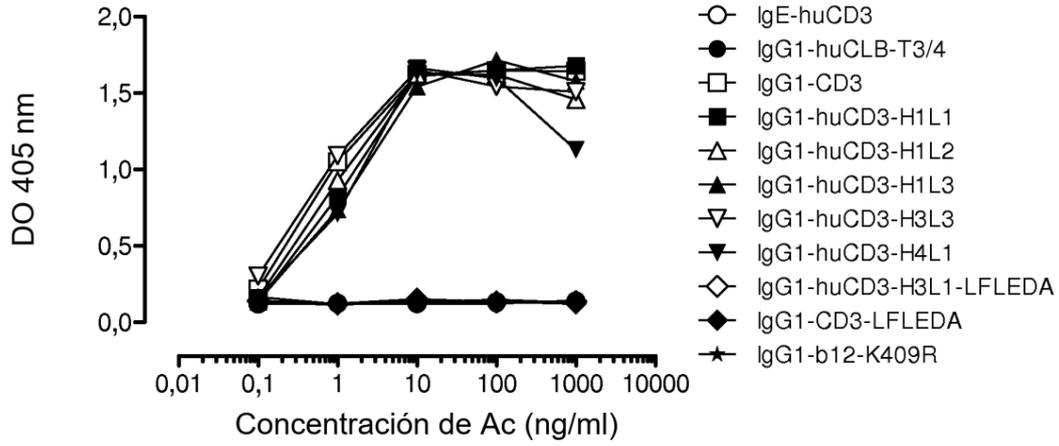


Figura 15

A

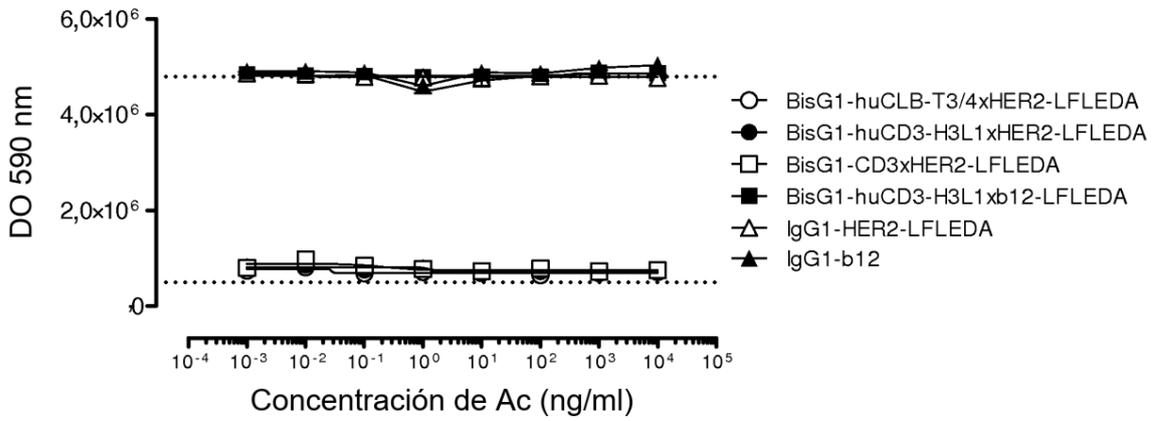


Figura 15 cont.

B

