

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 455**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2015 PCT/US2015/061139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16081490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2015 E 15801637 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3221359**

54 Título: **Métodos para tratamiento tumoral usando anticuerpo biespecífico CD3xCD20**

30 Prioridad:

17.11.2014 US 201462080716 P
13.05.2015 US 201562160788 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2021

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

SMITH, ERIC;
DAVIS, SAMUEL;
VARGHESE, BINDU;
KIRSHNER, JESSICA R.;
THURSTON, GAVIN;
LOWY, ISRAEL y
BROWNSTEIN, CARRIE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 809 455 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

Métodos para tratamiento tumoral usando anticuerpo biespecífico CD3xCD20

- 5 Esta solicitud incorpora, como referencia, el Listado de Secuencias presentado en un formulario legible en ordenador como nombre de archivo 10162WO01_ST25.txt creado el 3 de junio, 2014 (83.392 bytes).

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos, dirigidos a los antígenos CD20 y CD3, y métodos de destrucción tumoral. La presente invención también se refiere a métodos para reducir y/o controlar las funciones efectoras que pueden resultar de la unión a Fc en asociación con terapias de anticuerpos para tratamiento tumoral.

Antecedentes

- 15 Un anticuerpo biespecífico que tiene un grupo de unión a CD20 y un grupo de unión a CD3 puede proporcionar la interferencia necesaria para aumentar la actividad antitumoral. Una tercera modalidad en tal anticuerpo biespecífico es el dominio Fc. Se ha encontrado que la modificación de las propiedades de unión a Fc aumenta la potencia antitumoral de un anticuerpo terapéutico.

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

- 30 Las estrategias terapéuticas actuales generalmente sugieren que las funciones efectoras reducidas (o la unión reducida al receptor gamma Fc) por dominios Fc modificados de anticuerpos pueden ser útiles para anticuerpos cuyo objeto es neutralizar o inhibir la actividad biológica de un antígeno (p.ej., bloqueadores o antagonistas de anticuerpos), o activar o iniciar la señalización celular cadena abajo (p.ej., agonistas de anticuerpos).

- 35 Sin embargo, el diseño de anticuerpos dirigidos contra tumores con función efectora reducida es contradictorio para la terapia tumoral, ya que se espera que reduzca la citotoxicidad (es decir, ADCC y CDC) de células diana que no será eficaz para tratar la enfermedad, es decir, destruir células tumorales o inhibir el crecimiento tumoral.

- 40 Una estrategia, descrita en el presente documento, utiliza la unión diferencial del receptor Fc combinada con la unión al antígeno biespecífico para dirigirse específicamente a marcadores tumorales, así como desencadenar la muerte de linfocitos T específicos de tumor. El dominio Fc del anticuerpo se diseña para controlar cuidadosamente la unión al receptor Fc para eliminar o reducir la destrucción indeseable de células como linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales y macrófagos con receptores de Fc. Un patrón de unión único con respecto a la interacción del receptor Fc que comprende interacciones de unión al receptor FcγRII, pero sin interacciones FcγRI o FcγRIII, es sorprendentemente beneficioso para una terapia de Ig de direccionamiento tumoral en el contexto de anticuerpos biespecíficos que se unen tanto a CD3 como a CD20. Aun así, es necesario encontrar mejores terapias que estimulen el sistema inmunitario y sean eficaces en ablación tumoral, sin causar un exceso de liberación de citoquinas y toxicidad para el paciente.

- 50 Las terapias biespecíficas actuales, como anticuerpos BiTE® (activador de linfocitos T biespecíficos), sin embargo, se administran en pequeñas dosis a intervalos frecuentes. Existe una necesidad médica insatisfecha de opciones de tratamiento adicionales con regímenes de dosificación tolerables para pacientes con neoplasias malignas de linfocitos B CD20+, especialmente aquellos pacientes que recaen o progresan después de la terapia inicial.

- 55 WO 2014/047231 describe anticuerpos biespecíficos que se unen a CD3 y CD20 y que pueden usarse en el tratamiento de tumores de linfocitos B.

Breve resumen de la invención

- 60 La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico para uso en un método para tratar o mejorar el cáncer de linfocitos B en un sujeto, que comprende administrar un protocolo de aumento de dosis que reduce el efecto de una cascada de citoquinas, en donde el protocolo de aumento de dosis comprende administrar una primera dosis del anticuerpo durante un primer periodo de tiempo y administrar consecutivamente una segunda dosis de dicho anticuerpo durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis,
- 65 en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico unido a cada uno del

primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde el dominio Fc quimérico comprende:

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

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

En este documento también se describen, en un primer aspecto, anticuerpos biespecíficos con dominios de unión a Fc alterados que se unen a CD3 y CD20 humanos y que además se diseñan para tener funciones efectoras específicas que no se encuentran en el repertorio natural del sistema inmune. Los anticuerpos según este aspecto de la divulgación son útiles, entre otros, para dirigirse a linfocitos T que expresan CD3, y para estimular la activación de linfocitos T, p.ej., en circunstancias en donde la destrucción mediada por linfocitos T es beneficiosa o deseable como parte de un anticuerpo biespecífico que dirige la activación de linfocitos T mediada por CD3 a tipos celulares específicos, como células tumorales anti-CD20. Los anticuerpos de la divulgación se administran en un protocolo de aumento de dosis para mejorar su eficacia para estimular el sistema inmunitario, es decir, activación de linfocitos T, mientras minimiza los efectos tóxicos, p.ej., tormenta de citoquinas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para tratar o mejorar el cáncer de linfocitos B, o un método de tratamiento en un sujeto, que comprende administrar una primera dosis del anticuerpo durante un primer periodo de tiempo y administrar consecutivamente una segunda dosis de dicho anticuerpo durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico unido a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, y el tratamiento o mejora del cáncer comprende: (a) suprimir el crecimiento tumoral en el sujeto, (b) mediar la lisis de linfocitos β en el sujeto, (c) tratar un cáncer de linfocitos B en el sujeto, (d) tratar el cáncer que es positivo para la expresión de CD20 en el sujeto, o (e) tratar el cáncer melanoma que expresa CD20 en el sujeto.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico para tratar o mejorar la carga tumoral o el cáncer, o un método de tratamiento en un sujeto, que comprende administrar una primera dosis del anticuerpo durante un primer periodo de tiempo y administrar consecutivamente una segunda dosis de dicho anticuerpo durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une al antígeno diana tumoral humano o antígeno específico de tumor, y un dominio Fc quimérico unido a cada uno del segundo dominios de unión a antígeno, y el tratamiento o mejora de la carga tumoral o cáncer comprende: (a) suprimir el crecimiento tumoral en el sujeto, (b) mediar la lisis de células tumorales en el sujeto, (c) tratar el cáncer que es positivo para el antígeno diana tumoral o expresión del antígeno específico de tumor en el sujeto, o (d) tratar el cáncer que expresa el antígeno diana tumoral, o tumores que expresan el antígeno específico de tumor en el sujeto.

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

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

La presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

5 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la secuencia de aminoácidos de LCVR enumerada en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

10 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprende un par de secuencias de aminoácidos contenidas dentro de los ejemplos de anticuerpos anti-CD3/CD20 enumerados en la Tabla 2. En determinados casos, el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10 (p.ej., Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2).

15 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

20 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

25 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

30 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

35 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

40 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

45 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende un par de secuencias de aminoácidos HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende las secuencias de aminoácidos HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 enumeradas en la Tabla 1, como el par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8/16 (p.ej., Anticuerpo 1 o Anticuerpo 2).

50 La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas en la Tabla 1. En determinados casos, el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 es SEQ ID NOs: 4-6-8-20-22-24; o 12-14-16-20-22-24 (p.ej., Anticuerpo 1 o Anticuerpo 2).

55 En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR como se define en los anticuerpos ejemplares enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contenido dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/18 (p.ej., Anticuerpo 1 o Anticuerpo 2). Los métodos y técnicas para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y pueden usarse para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR específicas divulgadas en el

presente documento. Las convenciones ejemplares que pueden usarse para identificar los límites de las CDR incluyen, p.ej., la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales y la definición de AbM es un compendio entre las estrategias de Kabat y Chothia. Véase, p.ej.,

5 Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); y Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). También están disponibles bases de datos públicas para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o partes de los mismos, por ejemplo, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de HCVR o LCVR enumeradas en la Tabla 1; en ciertos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre las secuencias de ácidos nucleicos de HCVR/LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos HCDR1 o HCDR2 o HCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en ciertos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos HCDR1 o HCDR2 o HCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 o LCDR2 o LCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en ciertos casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos LCDR1 o LCDR2 o LCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

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

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

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una HCVR como una LCVR, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, y en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. En determinados casos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre las secuencias de ácidos nucleicos de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma. En ciertos casos según este aspecto de la divulgación, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y LCVR, en donde la HCVR y LCVR se derivan del mismo anticuerpo anti-CD3 enumerado en la Tabla 1.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de CH enumeradas en la Tabla 2 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre las secuencias de ácidos nucleicos de CH enumeradas en la Tabla 2 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación también proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD3 y una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD20. Por ejemplo, la presente divulgación incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas

anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las HCVR, LCVR, y/o secuencias de CDR, y/o secuencias de CH como se establece en la Tabla 1 y la Tabla 2. Dentro del alcance de la presente divulgación también se incluyen células hospedadoras en donde se han introducido dichos vectores, así como métodos para producir los anticuerpos o partes de los mismos mediante el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que emiten la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y recuperación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo así producidos.

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

Según otro aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a CD3 y un antígeno diana, en donde la molécula comprende un dominio Fc quimérico que tiene una función efectora reducida. En ciertos casos, la molécula comprende un dominio Fc quimérico como se describe en este documento. Según ciertos casos ejemplares, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas se unen a CD3 y CD20; en este documento tales moléculas de unión a antígeno biespecíficas también se denominan "moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20". La parte anti-CD20 de la molécula biespecífica anti-CD3/anti-CD20 es útil para atacar a las células tumorales que expresan CD20 (p.ej., tumores de linfocitos B), y la parte anti-CD3 de la molécula biespecífica es útil para activar linfocitos T. La unión simultánea de CD20 en una célula tumoral y CD3 en un linfocito T media la destrucción dirigida (lisis celular) de la célula tumoral diana con el linfocito T activado y facilitada por células efectoras que se unen al dominio Fc quimérico. Por tanto, las moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación son útiles, entre otros, para tratar enfermedades y trastornos relacionados o causados por tumores que expresan CD20 (p.ej., linfomas y tumores melanoma).

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

Las moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación proporcionan además un método para supresión o regresión del melanoma CD20-positivo. Por tanto, la divulgación proporciona un método para tratar el melanoma en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéutica de moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación en donde la cantidad es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral, reducir la carga tumoral, o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto.

Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas según este aspecto de la presente divulgación comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20, y un dominio Fc quimérico. La presente divulgación incluye moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 (p.ej., anticuerpos biespecíficos) en donde cada dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) emparejada con una región variable de cadena ligera (LCVR). En ciertos ejemplos de la divulgación, el dominio de unión a antígeno anti-CD3 y el dominio de unión a antígeno anti-CD20 comprenden cada uno diferente, HCVR distintos emparejados con una LCVR común. Por ejemplo, como se ilustra en este documento en el Ejemplo 2, se construyeron anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende un par HCVR/LCVR derivado de un anticuerpo anti-CD3; y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR derivada de un anticuerpo anti-CD20 emparejado con una LCVR derivada de un anticuerpo anti-CD3 (p.ej., la misma LCVR que está incluida en el dominio de unión a antígeno CD3). En otras palabras, en las moléculas ejemplares desveladas en este documento, el emparejamiento de una HCVR de un anticuerpo anti-CD20 con una LCVR de un anticuerpo anti-CD3 crea un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 (pero no se une a CD3). En dichos casos, el primer y segundo dominios de unión a antígeno comprenden HCVR anti-CD3 y anti-CD20 distintas pero comparten una LCVR anti-CD3 común.

La presente divulgación proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR como se establece en la Tabla 1 o la Tabla 2. El primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 también puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR como se establece en la

- Tabla 1 o la Tabla 2. Según determinados casos, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende cualquiera de los pares de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR como se establece en la Tabla 1 o la Tabla 2. La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende cualquiera de las
- 5 secuencias de aminoácidos de cadena pesada CDR1-CDR2-CDR3 como se establece en la Tabla 1 o la Tabla 2, y/o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de cadena ligera CDR1-CDR2-CDR3 como se establece en la Tabla 1 o la Tabla 2.
- Según determinados casos, la presente divulgación proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende una región variable de
- 10 cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.
- 15 La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 18, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.
- 20 La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10/18.
- 25 La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un dominio CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 16, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO:
- 30 24, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.
- En determinados casos, el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 que comprende SEQ ID NOs: 16/24.
- 35 La presente divulgación también proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 comprende un dominio CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 14, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; un dominio CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y un dominio CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende
- 40 SEQ ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.
- 45 Ciertas moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 ejemplares, no limitantes de la divulgación incluyen un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 que comprende dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 12-14-16-20-22-24.
- 50 La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.
- 55 La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 18 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia. La presente divulgación también proporciona moléculas biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde el
- 60 segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 75 o una secuencia sustancialmente
- 65

similar de la misma que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

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

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

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

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

30 Ciertas moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 ejemplares, no limitantes de la divulgación incluyen un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 que comprende dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4-6-8-20-22-24 (p.ej., Anticuerpo 1 o Anticuerpo 2).

35 En un aspecto relacionado, la divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 en donde el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 comprende los dominios CDR de cadena pesada y ligera contenidos dentro de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera (HCVR/LCVR) de SEQ ID NOS: 2/18.

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

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

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico unido a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno. En un aspecto relacionado, el anticuerpo biespecífico puede unirse específicamente a FcγRIIA humano y FcγRIIB humano. La presente divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 que se unen preferentemente a FcγRIIA humano y FcγRIIB humano y muestran poca o ninguna afinidad de unión a FcγRI humano o FcγRIII humano. Los anticuerpos biespecíficos de la divulgación pueden unirse específicamente a FcγRIIA humano y FcγRIIB humano a afinidades más altas que los anticuerpos que se unen a FcγRI humano o FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, en donde el anticuerpo se une específicamente tanto a FcγRIIA humano como a FcγRIIB humano, y exhibe afinidad de unión K_D inferior a 1 μ M a cada uno de FcγRI humano y FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*.

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

10 En otros casos, el anticuerpo exhibe una mayor afinidad de unión por FcγRIIA humano respecto a su FcγRIIB humano de unión, medido en un ensayo *in vitro*. En aún otros casos, el anticuerpo se une a FcγRIIA humano y exhibe un valor K_D menor respecto a su FcγRIIB humano de unión, medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcγRIIA humano a 25 °C con un valor K_D entre 10 y 30 μM, medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcγRIIB humano a 25 °C que tiene un valor K_D entre 100 y 250 μM, medido en un ensayo *in vitro*.

15 En otro caso, el anticuerpo exhibe poca o ninguna afinidad de unión detectable a FcγRI humano, medido en un ensayo *in vitro*. En algunos casos, el anticuerpo exhibe poca o ninguna afinidad de unión detectable a FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*.

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

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

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

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

En algunos casos, el anticuerpo exhibe menos del 50 % de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de la población celular total.

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

En algunos casos, el anticuerpo exhibe una disminución de la destrucción de células portadoras de receptores Fc, como linfocitos NK o macrófagos, en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

40 En algunos casos, el anticuerpo exhibe una disminución de la destrucción de linfocitos T que tienen receptores Fc por linfocitos NK o macrófagos en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo silvestre.

45 En algunos casos, el anticuerpo exhibe afinidad de unión K_D para FcγRIIA humano mayor que su afinidad de unión K_D para FcγRIIB humano, que es mayor que su afinidad de unión K_D para FcγRI humano, que es mayor o igual que su afinidad de unión K_D para FcγRIII humano, medido en un ensayo *in vitro*. En otros casos, el anticuerpo exhibe afinidad de unión a FcγRIIA humano $K_D > FcγRIIB$ humano $> FcγRI$ humano $> FcγRIII$ humano, medido en un ensayo *in vitro*.

50 En algunos casos, el anticuerpo exhibe afinidad de unión K_D para FcγRIIA humano mayor que su afinidad de unión K_D para FcγRIIB humano, que es mayor que su afinidad de unión a FcγRIII humano K_D que es mayor o igual que su afinidad de unión a FcγRI humano K_D , medido en un ensayo *in vitro*. En otros casos, el anticuerpo exhibe afinidad de unión a FcγRIIA humano $K_D > FcγRIIB$ humano $> FcγRIII$ humano $> FcγRI$ humano, medido en un ensayo *in vitro*.

En algunos casos, el FcγRIII humano es FcγRIIIA humano o FcγRIIIB humano.

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

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

65 El anticuerpo biespecífico proporcionado para uso en la presente invención exhibe una mayor afinidad de unión por

FcγRIIA humano respecto a FcγRIIB humano, y exhibe poca o ninguna afinidad de unión detectable por FcγRI humano y FcγRIII humano, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

5 La divulgación proporciona anticuerpos biespecíficos que comprenden una región bisagra quimérica. En algunos aspectos, la región bisagra quimérica comprende restos de secuencia de aminoácidos de las posiciones 216 a 236 (numeración EU). Se construyen los anticuerpos biespecíficos de la divulgación en donde la bisagra quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) desde las posiciones 228 a 236 (numeración EU). En determinados casos, los anticuerpos biespecíficos de la divulgación comprenden una bisagra quimérica y la parte de bisagra superior de la bisagra quimérica comprende restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) de una bisagra superior IgG1. En otros casos, los anticuerpos biespecíficos de la divulgación comprenden una bisagra quimérica y la parte de bisagra superior de la bisagra quimérica comprende restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) de una bisagra superior IgG4.

15 En un caso, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 53). En otro caso, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 54). En determinados casos, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos del dominio IgG4 CH2 humano desde las posiciones 237 a 340 (numeración EU). En otros casos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio CH3 derivado de un dominio CH3 de IgG1 humana o un dominio CH3 de IgG4 humana. En aún otros casos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio CH1 de IgG1 humana y un dominio de CH3 de IgG1 humana. En más casos, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio CH1 de IgG4 humana y un dominio de CH3 de IgG4 humana. El anticuerpo biespecífico proporcionado para uso en la presente invención comprende un dominio Fc quimérico unido a cada uno el primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde el dominio Fc quimérico comprende:

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

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

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

60 En algunos aspectos, el método para preparar el anticuerpo biespecífico comprende opcionalmente transfectar la célula hospedadora de la etapa (a) con una molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena ligera capaz de unirse al antígeno CD20, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de la segunda cadena ligera y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de la segunda cadena ligera y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente entre sí.

65 En algunos casos, la primera cadena pesada comprende una región CH3 que comprende una modificación H95R (por

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

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

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

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

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

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

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

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

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 como se desvela en este documento. En un aspecto relacionado, la divulgación presenta una composición que es una combinación de una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 y un segundo agente terapéutico. En un caso, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combine ventajosamente con una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20. Los agentes ejemplares que pueden combinarse ventajosamente con una molécula de unión a antígeno biespecífico anti-CD3/anti-CD20 se discuten en detalle en otras partes del presente documento.

50 En otro aspecto más, la divulgación proporciona métodos terapéuticos para dirigirse a/destruir células tumorales que expresan CD20 usando una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación, en donde los métodos terapéuticos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación a un sujeto que lo necesite. En algunos casos, los métodos terapéuticos para dirigirse a/destruir células tumorales que expresan CD20 usando una molécula o anticuerpo de unión a antígeno biespecífico anti-CD3/CD20 de la divulgación comprenden administrar una primera dosis de la molécula o anticuerpo de unión a antígeno durante un primer periodo de tiempo y administrar consecutivamente una segunda dosis de dicho anticuerpo durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis.

65 En algunos casos, el uso de la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende administrar una primera dosis del anticuerpo durante un primer periodo de tiempo y administrar consecutivamente una segunda dosis de dicho anticuerpo durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis. En

determinados aspectos, la primera dosis del anticuerpo y la segunda dosis del anticuerpo están en una formulación adecuada.

5 La presente divulgación incluye el uso de una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado o causado por la expresión de CD20.

10 La presente divulgación también incluye un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno, un segundo dominio de unión a antígeno y una región constante de cadena pesada (CH) quimérica, en donde: el primer dominio de unión a antígeno se une a CD3, el segundo dominio de unión a antígeno se une a CD20, la región CH quimérica se une con mayor afinidad a FcγRIIA humano y FcγRIIB humano, en comparación con un anticuerpo que comprende una región CH de tipo silvestre, tal anticuerpo biespecífico para uso en la fabricación de un medicamento. La divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20, y una región CH quimérica que se une con mayor afinidad a FcγRIIA humano que a FcγRIIB humano, para su uso en la fabricación de un medicamento.

Otras realizaciones resultarán evidentes tras la revisión de la descripción detallada adjunta.

20 Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

40 **Figuras 7A-7F** muestran el volumen tumoral (en mm³) con el tiempo en ratones NSG implantados por vía subcutánea con una mezcla de células tumorales Raji y PBMC (o sin control de PBMC- Fig. 7D), mientras que se administró un anticuerpo biespecífico CD3xCD20 de la divulgación (Ab 1) o vehículo o anticuerpo de control después de implantación tumoral y tratamiento, comenzando el mismo día de la implantación tumoral (Día 0), y medido durante 25 días. Fig. 7A: Ningún ratón mostró inhibición del crecimiento tumoral con el tratamiento con Vehículo; Fig. 7B: 1 de 5 (1/5) ratones mostró inhibición del crecimiento tumoral con un tratamiento de 0,4 mg/kg de Ab5 de Control (Ab anti-FcγD1); Fig. 7C: 5/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral con 0,4 mg/kg de tratamiento con el Anticuerpo 1 (Ab 1); Fig. 7D: 0/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral donde no se implantaron PBMC y con un tratamiento con Ab1 de 0,4 mg/kg; Fig. 7E: 5/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral con 0,04 mg/kg de tratamiento con Ab 1; y Fig. 7F: 5/5 ratones mostraron inhibición del crecimiento tumoral con 0,004 mg/kg de tratamiento con Ab 1.

50 **Figuras 8A y 8B** muestran el volumen tumoral (en mm³) con el tiempo en ratones NSG implantados por vía subcutánea con una mezcla de células tumorales Raji y PBMC, y tratados con Ab1 (CD3xCD20-Fc quimérico) comparado con el vehículo, con o sin suplemento de IgG (Fig. 8A), o tratados con Ab4 (CD3xCD20-wtFc) comparado con el vehículo, con o sin suplemento con IgG (Fig. 8B). Ambos anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 demuestran una inhibición significativa del crecimiento tumoral con suplemento de IgG en este modelo. Como se ve en Fig. 8A, el anticuerpo biespecífico CD3xCD20-Fc quimérico (Ab 1) demuestra la inhibición completa del crecimiento tumoral durante el período de tiempo probado con o sin suplemento con IgG en este experimento.

60 **Figura 9** ilustra la regresión de tumores establecidos (~ 200-400 mm³) hacia el 14º día en ratones NSG tratados con anticuerpo biespecífico CD3xCD20. Los ratones NSG se implantaron por vía subcutánea con una mezcla de células tumorales Raji y PBMC (células emparejadas con HLA) 15 días antes del tratamiento, después los tumores se establecieron y midieron. Los ratones se trataron con 0,4 mg/kg de Anticuerpo 1 (anticuerpo CD3xCD20-Fc quimérico), o 0,4 mg/kg de control Ab5 (Ab anti-FcγD1), o control de vehículo una vez por semana (Día 7, Día 14, Día 21).

65 **Figura 10** ilustra la regresión de tumores establecidos (-500-900 mm³) hacia el 21º día en ratones NSG tratados con el anticuerpo biespecífico CD3xCD20. Los ratones NSG se implantaron por vía subcutánea con una mezcla de

células tumorales Raji y PBMC (células emparejadas con HLA) 15 días antes del tratamiento, después los tumores se establecieron y midieron. Los ratones se trataron con 0,4 mg/kg de Anticuerpo 1 (anticuerpo CD3xCD20-Fc quimérico), o 0,4 mg/kg de control Ab5 (Ab anti-FcγD1), o control de vehículo una vez por semana (Día 7, Día 14, Día 21).

Figuras 11A y 11B representan la potencia *in vivo* de la administración de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 de Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 comparado con la administración de anticuerpos monoespecíficos (rituximab) midiendo los cambios en los niveles de linfocitos B CD20+ o niveles de linfocitos T CD3+ en sangre periférica de monos cinomolgos en un estudio de 7 días. El Día 0 se administraron anticuerpos o placebo. Fig. 11A: Los niveles de linfocitos B en sangre periférica se redujeron significativamente el día 2 en todas las muestras, excepto placebo; Fig. 11B: Se observó una pérdida transitoria de linfocitos T el día 2 y se restableció a los niveles iniciales el día 4 en sangre periférica de animales tratados con anticuerpos biespecíficos. No se observó pérdida de linfocitos T (por debajo del valor inicial) en los grupos placebo o rituximab (Rituxan).

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

Figuras 13A y 13B representan la potencia *in vivo* de la administración de dosis bajas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 de Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 midiendo los cambios en los niveles de linfocitos B CD20+ o niveles de linfocitos T CD3+ en sangre periférica de monos cinomolgos en un estudio a largo plazo (2 meses). Los anticuerpos biespecíficos se administraron a 0,01 mg/kg o 0,001 mg/kg (1 µg/kg) el Día 0. Fig. 13A: Los niveles de células β en sangre periférica se empobrecieron significativamente el día 2 y los niveles se mantuvieron empobrecidos durante el estudio, similar a lo observado para animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (ver también Figuras 11A o 12A); Fig. 13B: Los animales tratados con dosis muy bajas (1 µg/kg) de anticuerpos biespecíficos experimentan la misma pérdida transitoria de linfocitos T y la recuperación que se observa en los animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (ver también Figuras 11B o 12B).

Figura 14 muestra la correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos en sangre periférica de animales tratados con Anticuerpo 1 CD3xCD20-Fc quimérico. Ya que la exposición a anticuerpos (símbolos abiertos) en la circulación de animales se empobrece con el tiempo, las poblaciones de linfocitos B (símbolos sólidos) comienzan a recuperarse (p.ej., como se observó el día 81 para el animal n.º 106881 (círculo sólido)).

Figura 15 muestra la correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos en sangre periférica de animales tratados con Anticuerpo 2 CD3xCD20-Fc quimérico. Ya que la exposición a anticuerpos (símbolos abiertos) en la circulación de animales se empobrece con el tiempo, Las poblaciones de linfocitos B (símbolos sólidos) comienzan a recuperarse (p.ej., como se observó el día 66 para el animal n.º 106876 (triángulo sólido) y el día 68 para el animal n.º 106877 (cuadrado sólido)).

Figura 16 muestra la correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos en sangre periférica de animales tratados con anticuerpo biespecífico CD3xCD20-wtFc (Ab 4). Ya que la exposición a anticuerpos (símbolos abiertos) en la circulación de animales se empobrece con el tiempo, Las poblaciones de linfocitos B (símbolos sólidos) comienzan a recuperarse (p.ej., como se observó el día 91 para el animal n.º 106870 (triángulo sólido) y el día 64 para el animal n.º 106872 (círculo sólido)).

Figuras 17A y 17B representan el empobrecimiento de linfocitos B de tejido en bazo (Fig. 17A) o ganglios linfáticos mesentéricos (Fig. 17B) de monos cinomolgos resultantes de la administración de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 en comparación con el anticuerpo monoespecífico anti-CD20, con dosis mucho más bajas (dosis de 0,01 a 1,0 mg/kg) administradas a las cohortes biespecíficas. Este empobrecimiento no se observó en la cohorte de animales de control con placebo en ninguno de los tejidos. Ambos anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (Ab1 y Ab 4) causaron un empobrecimiento de linfocitos B dependiente de la dosis en los órganos linfoides, y en dosis iguales o superiores a 0,1 mg/kg, Los anticuerpos biespecíficos empobrecen los linfocitos B con mayor eficacia que rituximab.

Figuras 18A y 18B ilustran que los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 inducen proliferación de PBMC humanas (Fig. 18A) o PBMC de cinomolgos (Fig. 18B) en un bioensayo *in vitro*, mientras que el Anticuerpo de Control 5 (-▲-; no específico de CD3xCD20) no exhibió actividad.

Figuras 19A y 19B ilustran destrucción mediana de Raji mediada por CD3xCD20 en un ensayo de citotoxicidad. La destrucción de células diana mediada por el anticuerpo 1 con valores de CE₅₀ representativos de 25,0 pM y 9,10 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. La destrucción de células diana mediada por el anticuerpo 4 con valores de CE₅₀ representativos de 15,7 pM y 1,73 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. No se observó actividad del control (-▲-).

Figuras 20A y 20B ilustran que el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 media la destrucción celular por linfocitos T sin tratamiento. Figura 20A muestra un diagrama de dispersión FACS representativo a la concentración más elevada de Anticuerpo 4 probada. Las células de tipo silvestre B16F10.9 están marcadas con CFDA-SE y los linfocitos B16F10.9/CD20 están marcados con Rastreador de Células Violetas. Las células efectoras no están marcadas. El segundo panel de Fig. 20A muestra que las células que expresan CD20 se eliminan (cuadrante

inferior derecho) mediante tratamiento con anti-CD3xCD20. Figura 20B muestra la proporción de linfocitos B16F10.9/CD20 supervivientes después de 48 horas en presencia de anticuerpos CD20xCD3, es decir, Anticuerpo 4 (wtFc), Anticuerpo 1 (Fc quimérico) o Ab 5 de Control, y PBMC. El porcentaje de supervivencia se determinó comparando el porcentaje de linfocitos B16F10.9/CD20 con los linfocitos B16F10.9 negativos para CD20 en la población de células vivas. Ab 4 y Ab 1 se dirigieron específicamente a linfocitos T humanos para destruir solo las células diana que expresan CD20 (Figura 20B) en una población celular mixta. La destrucción de células diana solo se observó en presencia de los anticuerpos biespecíficos, con linfocitos B16F10.9/CD20 empobrecidas de forma dependiente de la dosis por Anticuerpo 4 (CE₅₀ 12,8 pM) y Anticuerpo 1 (CE₅₀ 19,5 pM) (Figura 20B). Menos del 5 % de las células que expresan CD20 estaban vivas a la dosis más alta probada (10 µg/ml).

Figura 21 muestra el porcentaje de células activadas (CD69+) del total de células efectoras CD2+ en un ensayo de citotoxicidad de 48 horas dirigido a linfocitos B16F10.9/CD20, tal activación inducida por cualquiera de los anticuerpos CD20xCD3, es decir, Anticuerpo 4 (wtFc) o Anticuerpo 1 (Fc quimérico).

Figuras 22A y 22B ilustran que el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 indujo la agrupación de linfocitos T con las células diana (células CD20+) mediante sus grupos de unión biespecíficos. Las células efectoras se tiñen con CFSE y las células CD20+ se tiñen con Rastreador de Células Violetas, y se abren para separar los cuadrantes. Después de incubación con un anticuerpo de control irrelevante (Anticuerpo de Control 5), no aparece agrupamiento (doble tinción) en la mezcla celular (Fig. 22A). Después de incubación con el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 (Ab 4), los grupos de células aparecen porque están teñidos con CFSE y Violeta (ver el cuadrante superior izquierdo en el diagrama de dispersión de Fig. 22B, como se destaca por el cuadrado en negrita).

Figura 23 muestra un estudio del volumen tumoral (en mm³) en ratones NSG implantados por vía subcutánea con una mezcla de células tumorales Raji y PBMC mientras que un anticuerpo biespecífico CD3xCD20 de la divulgación (Ab 1) a 0,4 mg/kg, 2X/semana (i.p), Control de anticuerpo irrelevante Ab 6 a 0,4 mg/kg, 2X/semana (i.p), o el vehículo se comparó con rituximab, anticuerpo anti-CD20 a 8 mg/kg, 5X/semana (i.p), y CD19xCD3 BiTE a 0,5 mg/kg, 5X/semana (i.v). (Para CD19xCD3 BiTE, véase Nagorsen D, et al. Pharmacol Ther. Dic 2012; 136(3):334-42, 2012.) Cada uno se administró después de la implantación del tumor. Los datos se expresan como media (ETM) y se sometieron a análisis ANOVA. Ab1, que se dosificó 2x por semana i.p., fue comparable a la potencia de CD19xCD3 BiTE que se dosificó 5x/semana i.v. en este modelo *in vivo*.

Figura 24 muestra el estudio del volumen tumoral (en mm³) en ratones NSG implantados por vía subcutánea con mezcla de Raji/PBMC, análogamente a la Figura 23, sin embargo, el análisis ANOVA se proporciona para AB1, Ab 6 de Control, rituximab y control de vehículo. Ab 1 dosificado 2x por semana fue superior al tratamiento con rituximab (dosificado a 8 mg/kg; 5x/semana i.p.) para suprimir tumores Raji establecidos.

Figuras 25A y 25B ilustran el crecimiento tumoral retardado cuando el tratamiento se inició simultáneamente o posteriormente con trasplante de tumor hCD20/B16F10.9 en ratones humanizados tratados con anticuerpo biespecífico CD3xCD20. Fig. 25A: Los ratones hCD3 se implantaron por vía subcutánea con células de melanoma B16F10.9 transducidas con hCD20 y se trataron simultáneamente con 0,004 mg/kg o 0,4 mg/kg de anticuerpo 1 (anticuerpo CD3xCD20-Fc quimérico), o 4 mg/kg de Ab5 de control (Ab anti-FcD1) o control de vehículo (i.p. 2 veces por semana). Fig. 25B: Los ratones hCD3 se implantaron por vía subcutánea con células de melanoma hCD20/B16F10.9 y los tumores establecidos se trataron el día 10 y posteriormente con el anticuerpo 1 (anticuerpo CD3xCD20-Fc quimérico) o control. Los ratones se trataron i.p. dos veces por semana con 0,4 mg/kg o 4 mg/kg de Ab1, o 0,4 mg/kg de Ab5 de Control (Ab anti-FcD1), o control de vehículo.

Descripción detallada

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

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (p.ej., 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento puede usarse en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Definiciones

La expresión "CD3", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un antígeno que se expresa en linfocitos T como parte del receptor multimolecular de linfocitos T (TCR) y que consiste en un homodímero o heterodímero formado a partir de la asociación de dos de las cuatro cadenas receptoras: CD3-épsilon, CD3-delta, CD3-zeta, y CD3-gamma. Todas las referencias a proteínas, polipéptidos o fragmentos de proteína en este documento pretenden referirse a la versión humana de la proteína, polipéptido o fragmento de proteína respectivos a menos que se

especifique explícitamente como de una especie no humana. Por tanto, la expresión "CD3" significa CD3 humano a menos que se especifique que proviene de una especie no humana, p.ej., "CD3 de ratón", "CD3 de mono", etc.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "un anticuerpo que se une a CD3" o un "anticuerpo anti-CD3" incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente una subunidad CD3
única (p.ej., épsilon, delta, gamma o zeta), así como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente un complejo dimérico de dos subunidades CD3 (p.ej., dímeros gamma/épsilon,
10 delta/épsilon y zeta/zeta de CD3). Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden unirse a CD3 soluble y/o CD3 expresado en la superficie celular. CD3 soluble incluye proteínas CD3 naturales, así como variantes de proteínas CD3 recombinantes como, p.ej., construcciones CD3 monoméricas y diméricas, que carecen de un dominio transmembrana o que no están asociadas con una membrana celular.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "CD3 expresado en la superficie celular" significa una o más proteínas CD3 que se expresan en la superficie de una célula *in vitro* o *in vivo*, de modo que al menos una parte de una proteína CD3 está expuesta al lado extracelular de la membrana celular y es accesible a una parte de unión a antígeno de un anticuerpo. "CD3 expresado en la superficie celular" incluye proteínas CD3 contenidas dentro del contexto de un receptor de linfocitos T funcional en la membrana de una célula. La expresión "CD3 expresado en la superficie celular" incluye la proteína CD3 expresado como parte de un homodímero o heterodímero en la superficie de una célula (p.ej., gamma/épsilon, delta/épsilon y zeta/zeta de CD3). La expresión, "CD3 expresado en la superficie celular" también incluye una cadena CD3 (p.ej., CD3-épsilon, CD3-delta o CD3-gamma) que se expresa por sí misma, sin otros tipos de cadenas CD3, en la superficie de una célula. Una "CD3 expresado en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína CD3 expresado en la superficie de una célula que normalmente expresa la proteína CD3. Como alternativa, "CD3 expresado en la superficie celular" puede comprender o consistir en una proteína CD3 expresado en la superficie de una célula que normalmente no expresa CD3 humano en su superficie pero que ha sido diseñada artificialmente para expresar CD3 en su superficie.
25

30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-CD3" incluye tanto anticuerpos monovalentes con una sola especificidad, como anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer grupo que se une a CD3 y un segundo grupo que se une a un segundo antígeno (diana), en donde el grupo anti-CD3 comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se establece en Tabla 1 o Tabla 2 en este documento. Ejemplos de anticuerpos biespecíficos anti-CD3 se describen en otras partes del presente documento. La expresión "molécula de unión a antígeno" incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluyendo, p.ej., anticuerpos biespecíficos. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD3 también se describen en US 2007/0280945A1; y en la solicitud internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre, 2013 y publicada como WO2014/047231.
35

40 El término "CD20", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína CD20 humana a menos que se especifique que proviene de una especie no humana (p.ej., "CD20 de ratón", "CD20 de mono", etc.). La proteína CD20 humana tiene la secuencia de aminoácidos como en la secuencia de referencia NCBI NP_690605.1.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo anti-CD20" incluye anticuerpos monovalentes con una sola especificidad, como Rituxan (rituximab), como se describe en US 7.879.984. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 también se describen en US 7.879.984 y solicitud internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre, 2013 y publicada como WO2014/047231.

50 "Antígeno diana tumoral" se refiere a un antígeno diana expresado por células tumorales, sin embargo, puede ser expresado por la célula relacionada (o células sanas) antes de transformarse en un tumor. "Antígeno específico de tumor" se refiere a un antígeno que se expresa o existe dentro de la célula tumoral pero que generalmente no existe en una célula sana o en células de origen diferente.

55 El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier molécula de unión a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une o interactúa específicamente con un antígeno particular (p.ej., CD3). El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (p.ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes casos de la divulgación, las FR del anticuerpo anti-CD3 (o la parte de unión a antígeno de la misma) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse natural o artificialmente. Una secuencia consenso de aminoácidos se puede definir basándose en un análisis paralelo de dos o más CDR.
65

- El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos de unión al antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Las expresiones "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se utiliza en el presente documento, incluyen cualquier
- 5 polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden obtenerse, p.ej., de moléculas de anticuerpo completas, usando cualquier técnica convencional adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables, y opcionalmente constantes, de anticuerpo. Dicho ADN se conoce
- 10 y/o se puede adquirir fácilmente de, p.ej., fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, p.ej., fagotecas de anticuerpos), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o suprimir aminoácidos, etc.
- 15 Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (p.ej., una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas modificadas por ingeniería genética, tales como anticuerpos
- 20 específicos de dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio suprimido, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetraacuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (p.ej., nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón, también se abarcan dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno", como se usa en el presente documento.
- 25 Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que está adyacente a o en fase con una o más secuencias marco. En fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden situarse uno con respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.
- 30 En determinados casos, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio de fragmento constante (Fc), o de otro modo unido a un dominio Fc. Las configuraciones ejemplares, no limitantes de dominios variables y constantes que pueden encontrarse dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación incluyen: (i) V_H-C_{H1}-bisagra-C_{H2}-C_{H3}; (ii) V_H-bisagra-C_{H2}-C_{H3}; (iii) V_H-C_L; (iv) V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}; (v) V_L-C_{H2}-C_{H3}; y (vi) V_L-C_L. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ilustrativas enumeradas
- 35 anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar directamente unidos entre sí o pueden estar unidos (relacionados) por una bisagra quimérica total o parcial de la divulgación, o por C_{H1} total o parcial y bisagra quimérica. Una región bisagra puede consistir en al menos aminoácidos de bisagra superior e inferior que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una sola molécula de polipéptido. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender
- 40 un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (p.ej., mediante enlace(s) disulfuro).
- 45 Un formato de anticuerpos multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ejemplares divulgados en este documento, comprende típicamente al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable puede unirse específicamente a un antígeno separado. Los formatos multiespecíficos pueden adaptarse para uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación usando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.
- 50 Los anticuerpos de la presente divulgación se modifican para tener una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) disminuida o nula como se mide *in vitro*. "Citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo de la divulgación en presencia del complemento. "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (p.ej., Linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y de ese modo da lugar a la lisis de la célula diana. La CDC y la ADCC pueden medirse usando ensayos que son bien conocidos y están disponibles en la técnica. (Véase, p.ej., patentes de Estados Unidos N.ºs 5.500.362 y 5.821.337, y Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). La región constante de cadena pesada (CH) de un anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo para fijar el complemento y
- 55 mediar la citotoxicidad dependiente de células. Por tanto, la CH de un anticuerpo puede seleccionarse en función de si es deseable que el anticuerpo medie en la citotoxicidad.
- 60
- 65

En determinados casos, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir

5 restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (p.ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en donde las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

10 Los anticuerpos de la divulgación pueden, en algunos casos, ser anticuerpos humanos recombinantes. La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresados, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante introducido por transfección en una célula hospedadora

15 (descrito en más detalle posteriormente), anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos, recombinante (descrita posteriormente), anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de la línea

20 germinal humana. En determinados casos, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes están sujetos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de, y están relacionadas con, secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden existir en dos formas que están asociadas con heterogeneidad de bisagra. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de aproximadamente 150-160 kDa en donde los dímeros se mantienen juntos por un enlace disulfuro intercatenario de la cadena pesada.

30 En una segunda forma, los dímeros no están unidos mediante enlaces disulfuro intercatenarios y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta de una cadena ligera y pesada acopladas covalentemente (semianticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, incluso después de purificación por afinidad.

35 La frecuencia de aparición de la segunda forma en diversos isotipos de IgG intacta se debe a, pero sin limitación, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región bisagra del anticuerpo. Una sustitución de un único aminoácido en la región bisagra de la bisagra de IgG4 humana puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal *et al.* (1993) Molecular Immunology 30:105) hasta los niveles típicamente observados usando una bisagra de IgG1 humana. La presente divulgación incluye anticuerpos que tienen una o más mutaciones en la

40 región bisagra que pueden, en producción, por ejemplo, mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

Los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de al menos un componente de su entorno natural. Por ejemplo, un anticuerpo que se ha separado o retirado de al menos un

45 componente de un organismo, o de un tejido o célula en donde existe de forma natural o se produce de forma natural el anticuerpo, es un "anticuerpo aislado" para los fines de la presente divulgación. Un anticuerpo aislado también incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula recombinante. Los anticuerpos aislados son anticuerpos que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. Según determinados casos, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

50 Las regiones variables anti-CD3 o anti-CD20 descritas en este documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las cuales se derivaron los anticuerpos. Dichas mutaciones pueden averiguarse fácilmente comparando las secuencias de

55 aminoácidos divulgadas en este documento con secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se obtienen a partir de cualquiera de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que se obtuvo el anticuerpo, o en el

60 resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se mencionan en el presente documento colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la técnica, partiendo con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones

65 de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En determinados casos, todos los restos marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L mutan de vuelta a los restos encontrados en la secuencia de la línea germinal

humana de la que se obtuvo el anticuerpo. En otros casos, únicamente determinados restos mutan de vuelta a la secuencia de la línea germinal original, p.ej., únicamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros casos, uno o más del resto(s) marco y/o CDR están mutados a los restos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de la línea germinal de la cual se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, p.ej., en donde determinados restos individuales están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que otros restos determinados que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal diferente. Una vez obtenidas, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal pueden ensayarse fácilmente con respecto a una o más propiedades deseadas tales como, mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonista o agonistas mejoradas o potenciadas (según pueda ser el caso), menor inmunogenicidad, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están incluidos en la presente divulgación.

La presente divulgación también incluye regiones variables anti-CD3 o anti-CD20 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR desveladas en este documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-CD3 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR con, p.ej., 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones conservativas de aminoácidos respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR expuestas en la Tabla 1 de este documento.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno o puede tener diferentes efectos biológicos. Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce por yuxtaposición espacial de aminoácidos de diferentes segmentos de la cadena de polipéptido lineal. Un epítipo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En determinadas circunstancias, un epítipo puede incluir restos de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

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

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

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se menciona como identidad de secuencia, se mide típicamente usando un programa informático de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de

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

15 **Moléculas de unión a antígeno biespecíficas**

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser biespecíficos o multiespecíficos. El anticuerpo proporcionado para uso en la presente invención es biespecífico y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, p.ej., Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Los anticuerpos anti-CD3xCD20 de la presente divulgación pueden unirse o coexpresarse con otra molécula funcional, p.ej., otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse de forma funcional (p.ej., por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una especificidad de unión adicional.

Por tanto, la presente divulgación incluye anticuerpos biespecíficos en donde un grupo de una inmunoglobulina se une al CD3 humano, y el otro brazo de la inmunoglobulina es específico para un antígeno diana. El antígeno diana al que se une el otro grupo del anticuerpo biespecífico CD3 puede ser cualquier antígeno expresado en o cerca de una célula, tejido, órgano, microorganismo o virus, contra el cual se desea una respuesta inmune dirigida. El grupo de unión a CD3 puede comprender cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR o CDR como se establece en la Tabla 1 en este documento.

En el contexto de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación en donde un grupo del anticuerpo se une a CD3 y el otro grupo se une a un antígeno diana, el antígeno diana puede ser un antígeno asociado a tumor. Los ejemplos no limitantes de antígenos específicos asociados a tumores incluyen, p.ej., AFP, ALK, proteínas BAGE, BIRC5 (survivina), BIRC7, la β -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CALR, CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (p.ej., GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/kras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, proteínas MAGE (p.ej., MAGE-1, -2, -3, -4, -6, y -12), MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ES01, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLHI), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, antígeno Thompson-nouvelle (Tn), TRP-1, TRP-2, tirosinasa, y uroplaquina-3.

En el contexto de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación en donde un grupo del anticuerpo se une a CD3 y el otro grupo se une a un antígeno diana, El antígeno diana puede ser un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa. Los ejemplos no limitantes de antígenos asociados a enfermedades infecciosas incluyen, p.ej., un antígeno que se expresa en la superficie de una partícula viral, o se expresa preferentemente en una célula infectada con un virus, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste en VIH, hepatitis (A, B o C), virus del herpes (p.ej., HSV-1, HSV-2, CMV, HAV-6, VZV, virus Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus vaccinia, HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus de molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC, y virus de la encefalitis arboviral. Como alternativa, el antígeno diana puede ser un antígeno que se expresa en la superficie de una bacteria, o se expresa preferentemente en una célula que está infectada con una bacteria, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en clamidia, rickettsia, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospira, y bacterias de la enfermedad de Lyme. En determinados casos, el antígeno diana es un antígeno que se expresa en la superficie de un hongo, o se expresa preferentemente en una célula que está infectada con un hongo, en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), Mucorales (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*, etc.), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*. En determinados casos, el antígeno diana es un antígeno que se expresa en la superficie de un parásito, o se expresa preferentemente en una célula que está infectada con un parásito, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste en *Entamoeba*

histolytica, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Taenia crassiceps*, y *Brugia malayi*. Los ejemplos no limitantes de antígenos asociados a patógenos específicos incluyen, p.ej., gp120 de VIH, CD4 de VIH, glucoproteína L de hepatitis B, glucoproteína M de hepatitis B, glucoproteína S de hepatitis B, E1 de hepatitis C, E2 de hepatitis C, proteína específica de hepatocitos, gB del virus del herpes simple, gB de citomegalovirus y proteína de envoltura HTLV.

Según ciertos casos ejemplares, La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen específicamente a CD3 y CD20. En este documento tales moléculas pueden denominarse, p.ej., moléculas biespecíficas "anti-CD3/anti-CD20", o "anti-CD3/CD20", o "anti-CD3xCD20" o "CD3xCD20", u otra terminología similar.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de unión a antígeno" significa una proteína, polipéptido o complejo molecular que comprende o consiste en al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que sola, o en combinación con una o más CDR y/o regiones marco (FR) adicionales, se une específicamente a un antígeno particular. En determinados casos, una molécula de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo, como se definen esos términos en otras partes de este documento.

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

En ciertos ejemplos de la presente divulgación, la molécula de unión a antígeno biespecífica es un anticuerpo biespecífico. Cada dominio de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable de cadena pesada (HCVR) y un dominio variable de cadena ligera (LCVR). En el contexto de una molécula de unión a antígeno biespecífica que comprende un primer y un segundo dominios de unión a antígeno (p.ej., un anticuerpo biespecífico), las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo "A1" y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno pueden designarse con el prefijo "A2". Por tanto, en este documento las CDR del primer dominio de unión a antígeno pueden denominarse A1-HCDR1, A1-HCDR2, y A1-HCDR3; y las CDR del segundo dominio de unión a antígeno en este documento pueden denominarse A2-HCDR1, A2-HCDR2, y A2-HCDR3.

El primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden estar unidos directa o indirectamente entre sí para formar una molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente divulgación (es decir, ScFv biespecífico) unido adicionalmente a un dominio Fc. Como alternativa, el primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno pueden estar unidos a un dominio Fc separado. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación comprenderán típicamente dos dominios Fc que son cada uno individualmente parte de una cadena pesada de anticuerpo separada. El primer y el segundo de niños Fc pueden ser de la misma secuencia, excepto por tener una mutación en el dominio C_{H3} destinado a facilitar o facilidad de purificación de heterodiméricos (es decir, moléculas biespecíficas).

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio C_{H3} y un segundo dominio C_{H3} de Ig, en donde el primer y el segundo dominio C_{H3} de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En un caso, el primer dominio C_{H3} de Ig se une a la proteína A y el segundo dominio C_{H3} de Ig contiene una mutación que reduce o elimina la unión a la proteína A, como una modificación H435R (por numeración EU; H95R por numeración de exón IMGT). El segundo C_{H3} puede comprender además una modificación Y436F (por numeración EU; Y96F por IMGT). Otras modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo C_{H3} incluyen: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I por EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I por IMGT) en el caso de dominios C_{H3} de IgG1; y Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I por IMGT) en el caso de dominios C_{H3} de IgG4.

Pueden usarse otros formatos o tecnologías de anticuerpos biespecíficos para preparar las moléculas de unión a antígeno biespecíficas. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una primera especificidad de unión a antígeno puede unirse funcionalmente (p.ej., por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica. Los formatos biespecíficos ejemplares específicos que pueden usarse incluyen, sin limitación, p.ej., formatos biespecíficos basados en scFv o de diacuerpo, fusiones IgG-scFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, cuadroma, botón en ojal, cadena ligera habitual (p.ej., cadena ligera habitual con botón en ojal, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)cuerpo, cremallera de leucina, duocuerpo, IgG1/IgG2, Fab de acción doble (DAF)-IgG y formatos biespecíficos de Mab² (véase, p.ej., Klein *et al.*, 2012, "mAbs" 4:6, 1-11, y las referencias citadas en el mismo, para una revisión de los formatos anteriores).

En el contexto de moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación, los dominios Fc pueden comprender uno o más cambios de aminoácido (p.ej., inserciones, eliminaciones o sustituciones) en comparación con la versión quimérica especificada del dominio Fc, sin cambiar la funcionalidad deseada. Por ejemplo, la divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden una o más modificaciones en el dominio Fc dando como resultado un dominio Fc modificado que tiene una interacción de unión modificada (p.ej., mejorada o disminuida) entre Fc y FcRn. En un caso, la molécula de unión a antígeno biespecífica comprende una modificación en una región CH2 o CH3, en donde la modificación aumenta la afinidad del dominio Fc a FcRn en un entorno ácido (p.ej., en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, p.ej., una modificación en la posición 250 (p.ej., E o Q); 250 y 428 (p.ej., L o F); 252 (p.ej., L/Y/F/W o T), 254 (p.ej., S o T) y 256 (p.ej., S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (p.ej., L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (p.ej., H/F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (p.ej., 308F, V308F), y 434. En un caso, la modificación comprende una modificación 428L (p.ej., M428L) y 434S (p.ej., N434S); una modificación 428L, 259I (p.ej., V259I) y 308F (p.ej., V308F); una modificación 433K (p.ej., H433K) y 434 (p.ej., 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (p.ej., 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (p.ej., T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (p.ej., 308F o 308P).

Variantes de secuencia

Los anticuerpos y moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácido en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las que se derivaron los dominios de unión a antígeno individuales. Dichas mutaciones pueden averiguarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos divulgadas en este documento con secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. Las moléculas de unión a antígeno de la presente Divulgación pueden comprender dominios de unión a antígeno que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos ejemplares desveladas en este documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que se obtuvo el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o en una sustitución de aminoácidos conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se mencionan en el presente documento colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la técnica, partiendo con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En determinados casos, todos los restos de marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se vuelven a mutar a los restos encontrados en la secuencia original de la línea germinal de la cual se originó originalmente el dominio de unión al antígeno. En otros casos, únicamente determinados restos mutan de vuelta a la secuencia de la línea germinal original, p.ej., únicamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros casos, uno o más del resto(s) del marco y/o CDR están mutados a los restos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de la línea germinal que es diferente de la secuencia de la línea germinal de la cual se derivaba originalmente el dominio de unión al antígeno). Además, los dominios de unión a antígeno pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, p.ej., en donde determinados restos individuales están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que otros restos determinados que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o están mutados al resto correspondiente de una secuencia de la línea germinal diferente. Una vez obtenidas, los dominios de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de línea germinal pueden analizarse fácilmente para una o más propiedades deseadas como, mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonista o agonistas mejoradas o potenciadas (según pueda ser el caso), menor inmunogenicidad, etc. En la presente divulgación se incluyen moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno obtenidos de esta manera general.

La presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno en donde uno o ambos dominios de unión a antígeno comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR desveladas en este documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno que comprenden un dominio de unión a antígeno que tiene secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR con, p.ej., 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones conservativas de aminoácidos respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR desveladas en este documento. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en donde un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (p.ej., carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida:

asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y (7) cadenas laterales que contienen azufre que son cisteína y metionina. Son grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un reemplazo preservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet et al. (1992) *Science* 256:1443-1445. Un reemplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

- 10 La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se menciona como identidad de secuencia, puede medirse usando un software de análisis de secuencias. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como Gap y Bestfit que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de
- 15 secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos muy relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una mutada de la misma. Véase, p.ej., GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando parámetros por defecto o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (p.ej., FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones con la mejor superposición entre secuencias
- 20 de consulta y búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferente al comparar una secuencia de la divulgación con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, p.ej., Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

25 Unión dependiente del pH

La presente divulgación incluye anticuerpos biespecíficos anti-CD3/anti-CD20, con características de unión dependientes del pH. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 de la presente divulgación puede exhibir una unión reducida a CD3 a pH ácido en comparación con pH neutro. Como alternativa, los anticuerpos anti-CD3 de la divulgación pueden

30 exhibir una unión mejorada a CD3 a pH ácido en comparación con pH neutro. La expresión "pH ácido" incluye valores de pH inferiores a aproximadamente 6,2, p.ej., aproximadamente 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 o inferior. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 y 7,4.

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

- 45 Se pueden obtener anticuerpos con características de unión dependientes del pH, p.ej., rastreando una población de anticuerpos para la unión reducida (o potenciada) a un determinado antígeno a pH ácido en comparación con el pH neutro. Adicionalmente, las modificaciones del dominio de unión al antígeno a nivel de aminoácidos pueden producir anticuerpos con características dependientes del pH. Por ejemplo, mediante la sustitución de uno o más aminoácidos
- 50 de un dominio de unión al antígeno (p.ej., dentro de una CDR) con un resto de histidina, puede obtenerse un anticuerpo con unión al antígeno reducida a pH ácido en relación con el pH neutro.

Unión al receptor Fc

- 55 Se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 y anticuerpos de la divulgación que comprenden un dominio Fc quimérico, como un dominio constante bisagra-CH2-CH3 de una cadena pesada de Ig, derivado de diferentes isotipos de IgG y con características únicas con respecto a unión y activación del receptor Fc. Ciertos dominios Fc de la divulgación están diseñados para comprender una bisagra quimérica.

- 60 El término "quimérico", tal como se utiliza en el presente documento, significa compuesto de partes de diferente origen. La expresión "proteína quimérica" incluye una primera proteína de aminoácidos unida a una segunda proteína de aminoácidos que normalmente no está unida en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos normalmente pueden existir como proteínas separadas o en una disposición diferente en la misma proteína, y se unen en un polipéptido de fusión en una nueva disposición. Las proteínas quiméricas pueden crearse mediante diversos métodos conocidos en
- 65 la técnica, p.ej., mediante síntesis química o creando un polinucleótido que codifica los aminoácidos de la proteína quimérica en la disposición deseada. Las proteínas quiméricas ejemplares incluyen las secuencias bisagra quiméricas

que conectan los dominios de cadena pesada de IgG, y las proteínas de fusión diseñadas para producir los anticuerpos humanos y proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación.

5 Las proteínas quiméricas desveladas en este documento se diseñaron para minimizar la creación de epítopos inmunogénicos en las uniones, p.ej., en comparación con una región o dominio de IgG Fc de tipo silvestre. Por tanto, las proteínas modificadas genéticamente de la divulgación tienen una inmunogenicidad reducida y muestran una unión reducida a los receptores Fc, así como reducidas para funciones no efectoras.

10 El término "bisagra", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir la región de estos de aminoácidos consecutivos que conectan el C-terminal del dominio C_{H1} al N-terminal del dominio C_{H2} de una inmunoglobulina. Varios aminoácidos del N-terminal del dominio C_{H2}, que están codificados por el exón C_{H2}, también se consideran parte de la "bisagra inferior". Sin estar unido a ninguna teoría, se han caracterizado aminoácidos de la región bisagra de IgG1, IgG2 e IgG4 que comprenden 12-15 aminoácidos consecutivos codificados por un exón de bisagra distinto y
15 varios aminoácidos N-terminales del dominio C_{H2} (codificados por el exón C_{H2}) (Brekke, O. H., et al. Immunology Today 16(2):85-90 (1995)). Por otro lado, IgG3 comprende una región bisagra que consta de cuatro segmentos: un segmento superior que se asemeja a la región bisagra de IgG1 y 3 segmentos que son repeticiones idénticas de aminoácidos exclusivas de IgG3.

20 El término "bisagra quimérica", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir una proteína quimérica que comprende una primera secuencia de aminoácidos derivada de la región bisagra de una molécula de Ig y una segunda secuencia de aminoácidos derivada de la región bisagra de una clase o subclase diferente de molécula de Ig. Las bisagras quiméricas ejemplares de la presente divulgación comprenden una primera secuencia de aminoácidos, o una secuencia de "bisagra superior", derivada de una región bisagra de IgG1 humana o una región bisagra de IgG4 humana, y una segunda secuencia de aminoácidos, o una secuencia de "bisagra inferior", derivada
25 de una región bisagra de IgG2 humana. En determinados casos, la primera secuencia o "bisagra superior" comprende restos de aminoácido de las posiciones 216 a 227 según la numeración EU. En algunos casos, la segunda secuencia o "bisagra inferior" comprende estos de aminoácido de las posiciones 228 a 236 según la numeración EU.

30 Para los fines de esta divulgación, una región "bisagra superior" pretende incluir restos de aminoácido de las posiciones 216 a 227 según la numeración EU (restos de aminoácido de las posiciones 226 a 240 según la numeración de Kabat) (ver Figura 1). Se pretende que una región "bisagra inferior" incluya restos de aminoácido de las posiciones 228 a 236 según la numeración EU (restos de aminoácido de las posiciones 241 a 249 según la numeración de Kabat) (ver Figura 1).

35 En la presente divulgación para la conveniencia del practicante de la invención, en este documento se han identificado aminoácidos de la región bisagra para IgG1, IgG2 e IgG4 humanas mediante el sistema de numeración EU de Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological interest. 5a ed. US Department of Health and Human Services, Publicación del NIH N.º 91-3242 (1991)), también conocida como "numeración EU" o "índice EU", como se actualizan según el Diagrama Científico del IMGT®, IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®,
40 http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, creado: 17 de mayo de 2001, última actualización: 10 de enero de 2013.

45 La correspondencia entre la numeración EU para aminoácidos bisagra de IgG1, IgG2 e IgG4 humana, y la numeración del dominio único de IMGT, numeración de exón IMGT y convenciones de numeración de Kabat (ver también Kabat, E.A. et al., 1991, *supra*) se describen en las Tablas A a F como sigue:

Tabla A: Numeración de bisagra de IgG1

| Aminoácidos de IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857] | Numeración única de IMGT para la BISAGRA ^a | Numeración del Exón de IMGT ^a | Numeración EU | Numeración de Kabat |
|--|---|--|---------------|-------------------------------------|
| (E) | 1 | 1 | 216 | 226 |
| P | 2 | 2 | 217 | 227 |
| K | 3 | 3 | 218 | 228 |
| S | 4 | 4 | 219 | 232 ^a [229] ^b |
| C | 5 | 5 | 220 | 233 ^a [230] ^b |
| D | 6 | 6 | 221 | 234 ^a [232] ^b |
| K | 7 | 7 | 222 | 235 |
| T | 8 | 8 | 223 | 236 |
| H | 9 | 9 | 224 | 237 |
| T | 10 | 10 | 225 | 238 |
| C | 11 | 11 | 226 | 239 |
| P | 12 | 12 | 227 | 240 |

ES 2 809 455 T3

| | | | | |
|---|----|----|-----|-----|
| P | 13 | 13 | 228 | 241 |
| C | 14 | 14 | 229 | 242 |
| P | 15 | 15 | 230 | 243 |

Tabla B: Numeración de bisagra de dominio C de IgG1

| Aminoácidos de IgG1 (IGHG1) [SwissProt P018571] | Numeración única de IMGT para Dominios C^a | Numeración del Exón de IMGT ^a | Numeración EU | Numeración de Kabat |
|---|---|--|---------------|---------------------|
| (A) | 1,6 | 1 | 231 | 244 |
| P | 1,5 | 2 | 232 | 245 |
| E | 1,4 | 3 | 233 | 246 |
| L | 1,3 | 4 | 234 | 247 |
| L | 1,2 | 5 | 235 | 248 |
| G | 1,1 | 6 | 236 | 249 |

Tabla C: Numeración de bisagra de IgG2

| Aminoácidos de IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859] | Numeración única de IMGT para la BISAGRA^a | Numeración del Exón de IMGT ^a | Numeración EU | Numeración de Kabat |
|--|---|--|-------------------------------------|---------------------|
| (E) | 1 | 1 | 216 | 226 |
| R | 2 | 2 | 217 | 227 |
| K | 3 | 3 | 218 | 228 |
| C | 4 | 4 | 219 ^a (221) ^b | 232 |
| C | 5 | 5 | 220 ^a (-) ^b | 233 |

| | | | | |
|---|----|----|-----|-----|
| V | 6 | 6 | 222 | 235 |
| E | 7 | 7 | 224 | 237 |
| C | 8 | 8 | 226 | 239 |
| P | 9 | 9 | 227 | 240 |
| P | 10 | 10 | 228 | 241 |
| C | 11 | 11 | 229 | 242 |

(continuación)

| Aminoácidos de IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859] | Numeración única de IMGT para la BISAGRA^a | Numeración del Exón de IMGT ^a | Numeración EU | Numeración de Kabat |
|--|---|--|---------------|---------------------|
| P | 12 | 12 | 230 | 243 |

Tabla D: Numeración de bisagra de dominio C de IgG2

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

Tabla E: Numeración de bisagra de IgG4

| Aminoácidos de IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861] | Numeración única de IMGT para la BISAGRA^a | Numeración del Exón de IMGT ^a | Numeración EU | Numeración de Kabat |
|--|---|--|-----------------------------------|---------------------|
| (E) | 1 | 1 | 216 | 226 |
| S | 2 | 2 | 217 | 227 |
| K | 3 | 3 | 218 | 228 |
| Y | 4 | 4 | - ^a (219) ^b | 229 |

| | | | | |
|---|----|----|-----------------------------------|-----|
| G | 5 | 5 | - ^a (220) ^b | 230 |
| P | 6 | 6 | 224 | 237 |
| P | 7 | 7 | 225 | 238 |
| C | 8 | 8 | 226 | 239 |
| P | 9 | 9 | 227 | 240 |
| S | 10 | 10 | 228 | 241 |
| C | 11 | 11 | 229 | 242 |
| P | 12 | 12 | 230 | 243 |

Tabla F: Numeración de bisagra de dominio C de IgG4

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

Los aminoácidos que resultan del empalme del exón se muestran entre paréntesis.
 - significa número informado no correspondiente
 - significa aminoácido no correspondiente en esta posición
^a numeración según el último Diagrama Científico actualizado del IMGT
^b numeración según el índice EU como se informa en Kabat, EA, et al. 1991
 Véase también, p.ej., Lefranc, M.-P. et al., Devel Comp Immunol, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. et al. PNAS USA, 63:78-85 (1969).

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

10 Por ejemplo, la afinidad de unión corresponde típicamente a un valor K_D de aproximadamente 10^{-7} M o inferior, como aproximadamente 10^{-8} M o inferior, como aproximada de 10^{-9} M o inferior cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 que utiliza el antígeno o FcR como ligando y anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc como analito (o antiligando). En consecuencia, el anticuerpo u otra proteína de unión se une al antígeno o receptor predeterminado con una afinidad correspondiente a un valor K_D que es al menos diez veces inferior, como al menos 100 veces inferior, por ejemplo al
 15 menos 1.000 veces inferior, como al menos 10.000 veces inferior, por ejemplo, al menos 100.000 veces inferior que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (p.ej., BSA, caseína).

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

30 El término " k_d " (s⁻¹ o 1/s), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo, o proteína que contiene Fc a un FcγR. Dicho valor también se conoce como valor k_d .

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

El término "K_a" (M-1 o 1/M), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, o la constante de equilibrio de asociación de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo, o proteína que contiene Fc a un FcγR. La constante de equilibrio de asociación se obtiene dividiendo la K_a entre la K_d.

5 El término "CE₅₀" o "CE₅₀", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la concentración eficaz semimáxima, que incluye la concentración de un anticuerpo que induce una respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición específico. La CE₅₀ representa esencialmente la concentración de un anticuerpo donde se observa el 50 % de su efecto máximo. Por tanto, se observa una unión reducida con un
10 aumento de la CE₅₀, o valor de concentración eficaz semimáxima.

En un caso, la unión disminuida puede definirse como un aumento de la concentración de anticuerpos CE₅₀ que permite la unión a la cantidad semimáxima de células diana.

15 En algunos casos, la disminución de la actividad citotóxica, como ADCC o CDC, puede definirse como un aumento de la concentración de anticuerpos CE₅₀ que permite la lisis de la cantidad semimáxima de células diana. La citotoxicidad también se mide como porcentaje de citotoxicidad, o porcentaje de lisis, que es la fracción de una población total de células observada como lisada en un ensayo de liberación de calceína o un ensayo equivalente. El porcentaje de citotoxicidad puede medirse como se describe en el Ejemplo 6.

20 En otros casos, la disminución de la proliferación puede definirse como un aumento de la concentración de anticuerpos CE₅₀ que permite la proliferación de la cantidad semimáxima de células diana.

25 La expresión "funciones efectoras", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir las capacidades funcionales impartidas por una proteína que contiene Fc al unirse a un FcγR. Sin quedar unido a ninguna teoría, la formación de un complejo Fc/FcγR recluta una variedad de células efectoras a sitios de antígeno unido, dando como resultado típicamente diversos sucesos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunitarias posteriores.

30 Las proteínas de unión a antígeno que contienen Fc quimérico y anticuerpos de la divulgación muestran funciones efectoras alteradas o reducidas en comparación con las proteínas o anticuerpos de unión a antígeno que contienen Fc de tipo silvestre correspondientes. Véase, p.ej., Publicación PCT N.º WO 2014/121087, publicado el 07 de agosto, 2014.

35 En algunos casos, la función efectora que se reduce o altera es una función efectora citotóxica, p.ej., citotoxicidad, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). En un caso, la función efectora que se reduce o altera es citotoxicidad dependiente del complemento. En otro caso, la función efectora que se reduce o altera es citotoxicidad dependiente de anticuerpos. En otros casos, la función efectora que se reduce o altera es proliferación celular de las células diana.

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

La unión de un Fc de Ig a su receptor lleva estas células efectoras a sitios del antígeno unido, resultando finalmente en una variedad de señalización y respuestas inmunitarias, incluyendo activación de linfocitos B, respuestas inflamatorias, respuestas citotóxicas, y respuestas fagocíticas. Como tal, la unión reducida o alterada de un Fc de Ig a su receptor puede dar como resultado funciones efectoras reducidas.

La expresión "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos", o "ADCP", se relaciona con un efecto o función que elimina (o destruye) una célula diana al envolver la célula diana en lugar de inducir la citólisis. ADCP puede ser un importante mecanismo *in vivo* para destruir células tumorales. ADCP puede medirse mediante métodos de citometría de flujo de fluorescencia de dos colores, por ejemplo métodos que utilizan, p.ej., PKH2 (colorante fluorescente verde)

y anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (rojo) contra diferentes proteínas de la superficie celular para diferenciar las células de ensayo, determinando así la actividad fagocítica y la tasa de fagocitosis. Las medidas de ADCP se conocen bien en la técnica. Las estrategias terapéuticas que activan selectivamente FcγRIIIa respecto a FcγRIIb pueden mejorar la actividad fagocítica de los macrófagos (Richards, JO, et al. 2008 Mol Cancer Ther 7(8):2517-27). Las proteínas quiméricas que se unen al antígeno que contienen Fc y los anticuerpos de la divulgación se unen y activan FcγRIIIa humano. En determinadas circunstancias, las proteínas de unión a antígeno y anticuerpos de la divulgación se unen a FcγRIIIa humano con mayor afinidad de unión que los anticuerpos a FcγRIIb. En algunos casos, el anticuerpo exhibe afinidad de unión K_D a FcγRIIIa humano más de aproximadamente 5 veces superior que su afinidad de unión K_D a FcγRIIb humano. En otros casos, el anticuerpo exhibe afinidad de unión K_D a FcγRIIIa humano superior a aproximadamente 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, o 20 veces superior a su afinidad de unión K_D FcγRIIb humano.

Características biológicas de los anticuerpos y moléculas de unión a antígeno inespecíficas

La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 y CD20 humanos. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-CD3xCD20 que se unen a células de Jurkat (CD3+) y células de Raji (CD20+) con un valor CE₅₀ inferior a aproximadamente 60 nM, medido mediante un ensayo de unión *in vitro*, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en este documento (p.ej., evaluando la unión de células de Jurkat o células de Raji a los anticuerpos CD3xCD20), o un ensayo sustancialmente similar. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CD3 o CD20 en la superficie de la célula (p.ej., célula de Jurkat y/o célula de Raji) con un valor CE₅₀ inferior a aproximadamente 75 nM, menos de aproximadamente 70 nM, menos de aproximadamente 65 nM, menos de aproximadamente 60 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 40 nM, menos de aproximadamente 30 nM, o menos de aproximadamente 25 nM, medido mediante un ensayo de unión *in vitro*, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 4 en este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno inespecíficas (p.ej., anticuerpos inespecíficos) que pueden unirse simultáneamente a CD3 humano y CD20 humano. Según determinados casos, Las moléculas de unión a antígeno inespecíficas interactúan específicamente con las células que expresan CD3 y/o CD20. El grado en que una molécula de unión a antígeno inespecífica se une a células que expresan CD3 y/o CD20 puede evaluarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), como se ilustra en el Ejemplo 4 en este documento. Por ejemplo, la presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno inespecíficas que se unen específicamente a líneas de linfocitos T humanos que expresan CD3 (p.ej., Jurkat), líneas de células β humanas que expresan CD20 (p.ej., Raji) y linfocitos T de primate (p.ej., células mononucleares de sangre periférica de cinomolgos [PBMC]). La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno inespecíficas que se unen a cualquiera de las células y líneas celulares mencionadas anteriormente con un valor CE₅₀ de aproximadamente 8,74 x10⁻⁶ a aproximadamente 5,99 x 10⁻⁸, o inferior, como se determina usando un ensayo FACS como se expone en el Ejemplo 4 o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación incluye anticuerpos inespecíficos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 humano con alta afinidad. La presente divulgación también incluye anticuerpos inespecíficos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 humano con afinidad media o baja, dependiendo del contexto terapéutico y las propiedades de direccionamiento particulares que se deseen. Por ejemplo, en el contexto de una molécula de unión a antígeno inespecífica, en donde un grupo se une a CD3 y otro grupo se une a un antígeno / (p.ej., CD20), puede ser deseable que el grupo de unión a antígeno diana se una al antígeno diana con alta afinidad mientras que el grupo anti-CD3 se une a CD3 solo con afinidad moderada o baja. De esta manera, puede conseguirse la orientación preferente de la molécula de unión a antígeno a células que expresan el antígeno diana mientras se evita la unión de CD3 general/no dirigida y los consiguientes efectos secundarios adversos asociados con ella.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3 humano e inducen la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-CD3xCD20 que inducen la destrucción de células tumorales mediada por linfocitos T con una CE₅₀ inferior a aproximadamente 60 pM, medido en un ensayo de destrucción de células tumorales *in vitro* mediado por linfocitos T, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 en este documento (p.ej., evaluando el alcance de la muerte de células tumorales Raji por PBMC humanas en presencia de anticuerpos anti-CD3), o un ensayo sustancialmente similar. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación inducen la muerte de células tumorales mediada por linfocitos T (p.ej., destrucción de células de Raji mediada por PBMC) con un valor CE₅₀ inferior a aproximadamente 56 pM, inferior a aproximadamente 50 pM, inferior a aproximadamente 45 pM, inferior a aproximadamente 40 pM, inferior a aproximadamente 35 pM, inferior a aproximadamente 30 pM, inferior a aproximadamente 25 pM, inferior a aproximadamente 20 pM, inferior a aproximadamente 15 pM, inferior a aproximadamente 10 pM, inferior a aproximadamente 5 pM, o inferior a aproximadamente 1 pM, medido por un ensayo de destrucción de células tumorales *in vitro* mediado por linfocitos T, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 en este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a

CD3/CD20 humano e inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), aunque en menor medida que los anticuerpos que tienen un dominio Fc de IgG de tipo silvestre. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-CD3xCD20 que inducen la muerte por CDC de células de Raji o Daudi (que expresan CD20) con un porcentaje de citotoxicidad (% de citotoxicidad) inferior a aproximadamente 50 %, medido en un ensayo de destrucción de células tumorales *in vitro* mediado por linfocitos T, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 en este documento (p.ej., evaluando el grado de destrucción de células diana (Raji o Daudi) en presencia de anticuerpos complementarios y anti-CD3xCD20), o un ensayo sustancialmente similar. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno inducen la destrucción de células CDC (p.ej., muerte mediada por complemento de células de Raji o Daudi) con un porcentaje de citotoxicidad inferior a aproximadamente el 45 %, inferior a aproximadamente el 40 %, inferior a aproximadamente el 35 %, inferior a aproximadamente el 30 %, inferior a aproximadamente el 25 %, inferior a aproximadamente el 20 %, inferior a aproximadamente el 15 %, inferior a aproximadamente el 10 %, inferior a aproximadamente el 5 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a la citotoxicidad de fondo, o no hay citotoxicidad detectable medida por un ensayo de destrucción celular *in vitro* mediado por complemento, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 en este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3/CD20 humano que no inducen significativamente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en comparación con los anticuerpos que tienen un dominio Fc de IgG de tipo silvestre. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-CD3xCD20 sin destrucción apreciable de células de Raji o Daudi (que expresan CD20) con un porcentaje de citotoxicidad (% de citotoxicidad) inferior a aproximadamente 20 % (o inferior a la citotoxicidad de fondo), medido en un ensayo de destrucción celular *in vitro* mediada por linfocitos NK, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 7 en este documento (p.ej., evaluando el grado de destrucción de células diana (Raji o Daudi) en presencia de linfocitos NK y anticuerpos anti-CD3xCD20), o un ensayo sustancialmente similar. Los ensayos sustancialmente similares pueden incluir la presencia de linfocitos NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos u otras células que expresan FcγRIII, incluyendo células que expresan FcγRIII variante. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno no muestran actividad ADCC detectable (p.ej., destrucción de células de Raji o Daudi mediada por linfocitos NK o FcγRIII) con un porcentaje de citotoxicidad inferior a aproximadamente el 30 %, inferior a aproximadamente el 25 %, inferior a aproximadamente el 20 %, inferior a aproximadamente el 15 %, inferior a aproximadamente el 10 %, inferior a aproximadamente el 5 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a la citotoxicidad de fondo, o sin actividad citotóxica detectable medida por un ensayo de destrucción celular *in vitro* mediado por FcγRIII, p.ej., usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 7 en este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

Según determinados casos, la presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen a antígenos que se unen a FcγRIIA humano (p.ej., a 25 °C) con una K_D inferior a aproximadamente 23,5 μM medido por resonancia de plasmón superficial, p.ej., usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en este documento. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a FcγRIIA con una K_D inferior a aproximadamente 20,5 μM, inferior a aproximadamente 20 μM, inferior a aproximadamente 19,3 μM, inferior a aproximadamente 18 μM, inferior a aproximadamente 17 μM, inferior a aproximadamente 16 μM, inferior a aproximadamente 15 μM, inferior a aproximadamente 10 μM, inferior a aproximadamente 9 μM, inferior a aproximadamente 8 μM, inferior a aproximadamente 7 μM, inferior a aproximadamente 6 μM, inferior a aproximadamente 5 μM, inferior a aproximadamente 4 μM, inferior a aproximadamente 3 μM, inferior a aproximadamente 2 μM, inferior a aproximadamente 1 μM, menos de aproximadamente 900 nM, menos de aproximadamente 800 nM, o menos de aproximadamente 700 nM, tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial, p.ej., usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en este documento (p.ej., formato de captura de mAb o captura de antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.

Según determinados casos, la presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen a antígenos que se unen a FcγRIIB humano (p.ej., a 25 °C) con una K_D inferior a aproximadamente 233 μM medido por resonancia de plasmón superficial, p.ej., usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en este documento. En determinados casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen a FcγRIIB con una K_D inferior a aproximadamente 200 μM, inferior a aproximadamente 190 μM, inferior a aproximadamente 180 μM, inferior a aproximadamente 170 μM, inferior a aproximadamente 160 μM, inferior a aproximadamente 150 μM, inferior a aproximadamente 140 μM, inferior a aproximadamente 130 μM, inferior a aproximadamente 125 μM, inferior a aproximadamente 123 μM, inferior a aproximadamente 120 μM, inferior a aproximadamente 110 μM, inferior a aproximadamente 100 μM, inferior a aproximadamente 90 μM, inferior a aproximadamente 80 μM, inferior a aproximadamente 70 μM, inferior a aproximadamente 60 μM, inferior a aproximadamente 50 μM, o inferior a aproximadamente 40 μM, tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial, p.ej., usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 8 en este documento (p.ej., formato de captura de mAb o captura de antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a CD3xCD20 con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) superior a aproximadamente 8 días, medida por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, p.ej., usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 9 en este documento, o un ensayo sustancialmente similar. En determinados casos, los anticuerpos exhiben un $t_{1/2}$ superior a

aproximadamente 5 días, superior a 6 días, superior a aproximadamente 7 días, superior a aproximadamente 8 días, superior a aproximadamente 9 días, superior a aproximadamente 10 días, superior a aproximadamente 11 días, superior a aproximadamente 12 días, superior a aproximadamente 13 días, superior a aproximadamente 14 días, superior a aproximadamente 15 días, o superior a aproximadamente 20 días, medido por resonancia de plasmón superficial a 25 °C o 37 °C, p.ej., usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 9 en este documento (p.ej., formato de captura de mAb o captura de antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.

La presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 que no exhiben actividad sustancial en uno o más ensayos seleccionados del grupo que consiste en: (a) inducir la proliferación de PBMC *in vitro*; (b) citotoxicidad CDC (ver, p.ej., Ejemplo 6 en este documento); (d) ADCC (ver, p.ej., Ejemplo 7 en este documento).

La presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 que exhiben actividad sustancial en uno o más ensayos seleccionados del grupo que consiste en: (a) empobrecimiento de linfocitos B (p.ej., linfocitos B CD45+/CD20+) en monos cinomolgos (véase, p.ej., Ejemplos 10 y 11 en este documento); (b) disminución del volumen del tumor de linfocitos B (p.ej., volumen del tumor Raji) en modelos de ratones inmunodeficientes (ver, p.ej., Ejemplo 12A); y (c) regresión de tumores en modelos de ratón con tumores establecidos (ver, p.ej., Ejemplo 12B).

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 que pueden empobrecer los linfocitos B en un sujeto (ver, p.ej., Ejemplo 10). Por ejemplo, según determinados casos, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20, en donde una administración única de la molécula de unión a antígeno biespecífica a un sujeto (p.ej., a una dosis de aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,9 mg/kg, de aproximadamente 0,8 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg, de aproximadamente 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,4 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,06 mg/kg aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, o inferior) provoca una reducción del número de linfocitos B en el sujeto (p.ej., en una muestra de sangre tomada del sujeto) por debajo de los niveles detectables. En determinados casos, una administración única de la molécula de unión al antígeno biespecífico anti-CD3/anti-CD20 a una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg provoca una reducción del número de linfocitos B en el sujeto por debajo de los niveles detectables aproximadamente hacia el día 7, hacia el día 6, hacia el día 5, hacia el día 4, hacia el día 3, aproximadamente el día 2, o aproximadamente el día 1 después de la administración de la molécula de unión a antígeno biespecífica al sujeto. Según determinados casos, una administración única de una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 de la divulgación, a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg, hace que el número de linfocitos B permanezca por debajo de niveles detectables hasta al menos aproximadamente 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días o más, después de la administración. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "por debajo de los niveles detectables" significa que no pueden detectarse linfocitos B directamente o indirectamente en una muestra de sangre extraída de un sujeto utilizando ensayos estándar de detección de linfocitos B, p.ej., un ensayo FACS para marcadores de linfocitos B, como se establece en el Ejemplo 10, en el presente documento.

Como alternativa, se dispone un solo, la primera dosis se administra a una dosis baja, como 10 µg, o 30 µg, o 100 µg, y luego, después de un periodo de tiempo, se administra una segunda dosis a una dosis más alta, como dos o tres veces mayor que la primera dosis, a fin de evitar, reducir o mejorar la tormenta de citoquinas en un paciente. Reducir la "tormenta de citoquinas" en un paciente se refiere a reducir el efecto de una cascada de citoquinas o hipercitoquinas, en donde dicha reacción inmunitaria negativa puede ser causada por, pero no se limita a, un circuito de retroalimentación positiva entre citoquinas y glóbulos blancos, y/o niveles muy elevados de varias citoquinas.

El anticuerpo biespecífico proporcionado para uso en la presente invención se proporciona para uso en un método para tratar o mejorar el cáncer de linfocitos B en un sujeto, que comprende administrar un protocolo de aumento de dosis que reduce el efecto de una cascada de citoquinas, en donde el protocolo de aumento de dosis comprende administrar una primera dosis del anticuerpo durante un primer periodo de tiempo y administrar consecutivamente una segunda dosis de dicho anticuerpo durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis.

Según el Ejemplo 20, en el presente documento, se administra una primera dosis (inicial) de la molécula de unión a antígeno biespecífica de la divulgación (p.ej., Ab 1), seguido de una segunda dosis posterior después de un periodo de tiempo, en donde la segunda dosis supera (es mayor que) la primera dosis. En algunos casos, la segunda dosis es aproximadamente 2 veces mayor o aproximadamente 3 veces mayor que la primera dosis. En otro caso, la molécula de unión a antígeno biespecífica se administra a la primera dosis semanalmente durante semanas consecutivas, como cuatro (4) semanas consecutivas. En otro caso, la primera dosis se administra semanalmente seguido de dosis mensuales durante un periodo de tiempo adicional (o un número designado de dosis mensuales). En algunos casos, siguiendo el régimen de dosificación designado para la primera dosis, la segunda dosis se administra semanalmente seguido de dosis mensuales durante un periodo de tiempo adicional. En algunos casos, la primera dosis (inicial) es de 10 µg y la segunda dosis es de 30 µg. En algunos casos, la primera dosis (inicial) es de 30 µg y la segunda dosis es de 100 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 100 µg y la segunda dosis es de 300 µg. En otros casos, la

primera dosis (inicial) es de 300 µg y la segunda dosis es de 100 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 1000 µg y la segunda dosis es de 2000 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 2000 µg y la segunda dosis es de 3000 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 3000 µg y la segunda dosis es de 4000 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 4000 µg y la segunda dosis es de 5000 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 5000 µg y la segunda dosis es de 6000 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 6000 µg y la segunda dosis es de 7000 µg. En otros casos, la primera dosis (inicial) es de 7000 µg y la segunda dosis es de 8000 µg.

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

Mapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

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

Para determinar si un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína pueden usarse diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Las técnicas ejemplares incluyen, p.ej., ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), análisis mutacional de barrido con alanina, análisis de transferencias de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), y análisis de escisión de péptidos. Además, pueden emplearse métodos tales como escisión de epítomos, extracción de epítomos y modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio hidrógeno/deuterio implica el marcaje con deuterio de la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que tenga lugar el intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los restos excepto los restos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión por proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando de esta manera los restos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interacciona el anticuerpo. Véase, p.ej., Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Para fines de mapeo de epítomos también puede usarse cristalografía de rayos X del complejo antígeno/anticuerpo.

La presente divulgación incluye además anticuerpos anti-CD3 que se unen al mismo epítomo que cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en este documento (p.ej., anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 en este documento). De manera análoga, la presente divulgación también incluye anticuerpos anti-CD3 que compiten por unirse a CD3 con cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en este documento (p.ej., anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos como se establece en la Tabla 1 en este documento).

La presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer

dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo en CD3 como un dominio de unión a antígeno específico de CD3 ejemplar descrito en este documento, y/o en donde el segundo dominio de unión a antígeno se une al mismo epítipo en CD20 como un dominio de unión a antígeno específico de CD20 ejemplar descrito en este documento.

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

Puede determinarse fácilmente si una molécula de unión a antígeno particular (p.ej., un anticuerpo) o un dominio de unión a antígeno de la misma se une al mismo epítipo o si compite por unirse a, una molécula de unión a antígeno de referencia de la presente divulgación usando métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo en CD3 (o CD20) como una molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia de la presente divulgación, primero se permite la unión de una molécula biespecífica de referencia a una proteína CD3 (o proteína CD20). A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de ensayo para unirse a la molécula CD3 (o CD20). Si el anticuerpo de ensayo puede unirse a CD3 (o CD20) después de unión de saturación con la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia, puede concluirse que el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente de CD3 (o CD20) que la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de ensayo no puede unirse a la molécula CD3 (o CD20) después de unión de saturación con la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo puede unirse al mismo epítipo de CD3 (o CD20) que el epítipo unido por la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia de la divulgación. Después puede realizarse una experimentación de rutina adicional (p.ej., análisis de mutación de péptidos y unión peptídica) para confirmar si la falta observada de unión del anticuerpo de ensayo se debe realmente a la unión al mismo epítipo que la molécula de unión a antígeno biespecífica de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo pueden realizarse usando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión de anticuerpos disponible en la técnica. Según ciertos casos de la presente divulgación, dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo epítipo (o superpuesto) si, p.ej., un exceso en un factor de 1, 5-, 10-, 20 o 100 veces de una proteína de unión a antígeno inhibe la unión de la otra en al menos un 50 %, pero preferentemente un 75 %, 90 % o incluso un 99 %, medida en un ensayo de unión competitiva (véase, p.ej., Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Como alternativa, se considera que dos proteínas de unión a antígeno se unen al mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reducen o eliminan la unión de la otra. Se considera que dos proteínas de unión a antígeno tienen "epítopos superpuestos" si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión a antígeno reduce o elimina la unión de la otra.

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

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

Los dominios de unión a antígeno específicos para antígenos particulares pueden prepararse mediante cualquier tecnología generadora de anticuerpos conocida en la técnica. Una vez obtenidas, dos dominios de unión a antígeno diferentes, específicos para dos antígenos diferentes (p.ej., CD3 y CD20), pueden disponerse apropiadamente uno con respecto al otro para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica de la presente divulgación usando métodos de rutina. (Una discusión de formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares que pueden usarse para construir las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación se proporciona en otras partes del presente documento). En determinados casos, uno o más de los componentes individuales (p.ej., cadenas pesadas y ligeras) de las moléculas de unión a antígeno multiespecíficas de la divulgación se derivan de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Los métodos para fabricar tales anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una o más de las cadenas pesadas y/o ligeras de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación pueden prepararse usando la tecnología VELOCIMMUNE™. Usando la tecnología

VELOCIMMUNE™ (o cualquier otra tecnología de generación de anticuerpos humanos), los anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra un antígeno particular (p.ej., CD3 o CD20) se aíslan inicialmente con una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y seleccionan por características deseables, entre las que se incluyen la afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una
 5 región constante humana deseada para generar cadenas pesadas y/o ligeras completamente humanas que pueden incorporarse en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación.

Los animales genéticamente modificados pueden usarse para hacer moléculas de unión a antígeno biespecíficas humanas. Por ejemplo, puede usarse un ratón genéticamente modificado que es incapaz de reorganizar y expresar una secuencia variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón, en donde el ratón expresa solo uno o dos dominios variables de cadena ligera humana codificados por secuencias de inmunoglobulina humana unidas operativamente al gen constante kappa de ratón en el locus kappa de ratón endógeno. Tales ratones genéticamente modificados pueden usarse para producir moléculas de unión a antígeno biespecíficas completamente humanas que comprenden dos cadenas pesadas diferentes que se asocian con una cadena ligera idéntica que comprende un dominio variable derivado de uno de dos segmentos de genes de región variable de cadena ligera humana diferentes. (Véase, p.ej., US 2011/0195454 para una discusión detallada de tales ratones diseñados y su uso para producir moléculas de unión a antígeno biespecíficas).

Bioequivalentes

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de las moléculas ejemplares desveladas en este documento pero que retienen la capacidad de unirse a CD3 y/o CD20. Tales moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia precursora, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno que son bioequivalentes a cualquiera de las moléculas de unión a antígeno ejemplares expuestas en este documento. Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, en una sola dosis o en múltiples dosis. Algunas proteínas de unión a antígeno se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el mercado, no son esenciales para obtener las concentraciones eficaces del fármaco en el organismo en, p.ej., el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacológico particular estudiado.

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

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

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

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

Las variantes bioequivalentes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas ejemplares expuestas en este documento pueden construirse mediante, por ejemplo, generando diversas sustituciones de restos o secuencias o eliminando restos terminales o internos o secuencias no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, pueden eliminarse restos de cisteína no esenciales para la actividad biológica, o remplazarse con otros aminoácidos, para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, las proteínas de unión a antígeno bioequivalentes pueden incluir variantes de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas ejemplares expuestas en este documento que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glicosilación de las moléculas, p.ej., mutaciones que eliminan o retiran la glicosilación.

Selectividad de especie y reactividad cruzada de especie

Según ciertos casos de la divulgación, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que se unen al CD3 humano pero no al CD3 de otras especies. También se proporcionan moléculas de unión a antígeno que se unen al CD20 humano pero no al CD20 de otras especies. La presente divulgación también incluye moléculas de unión a antígeno que se unen a CD3 humano y a CD3 de una o más especies no humanas; y/o moléculas de unión a antígeno que se unen al CD20 humano y al CD20 de una o más especies no humanas.

Según ciertos ejemplos de la divulgación, se proporcionan moléculas de unión a antígeno que se unen a CD3 humano y/o CD20 humano y pueden unirse o no unirse, según sea el caso, a uno o más CD3 y/o CD20 de ratón, rata, cobaya, hámster, jerbo, cerdo, gato, perros, conejo, cabra, ovejas, vacas, caballo, camello, cinomolgo, tití, rhesus o chimpancé. Por ejemplo, en un caso ejemplar particular de la presente divulgación, se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano y CD3 cinomolgo, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 humano.

15 Inmunoconjugados

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno conjugadas con un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunodepresor o un radioisótopo. Los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. En la técnica se conocen ejemplos de agentes citotóxicos y agentes quimioterapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados, (véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081).

Formulación terapéutica y administración

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

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

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

Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración en pluma tiene aplicaciones fácilmente en la administración de una composición farmacéutica de la presente divulgación. Dicho dispositivo inyector de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo inyector de pluma reutilizable usa en general un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y remplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo inyector de pluma puede entonces reutilizarse. En un dispositivo inyector de pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. Además, el dispositivo inyector de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición

farmacéutica, el dispositivo completo se desecha.

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

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En un caso, puede usarse una bomba (véase Langer, anteriormente citado; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). En otro caso, se pueden usar materiales poliméricos; véase, "Medical Applications of Controlled Release", Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Ratón, Florida. En todavía otro caso, un sistema de liberación controlada puede ubicarse en las proximidades de la diana de la composición, siendo necesaria, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p.ej., Goodson, 1984, en "Medical Applications of Controlled Release", supra, vol. 2, pág. 115-138). Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas farmacéuticas para la vía intravenosa, subcutánea, inyecciones intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, p.ej., disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso usado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros coadyuvantes, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (p.ej., etanol), un polialcohol (p.ej., propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [p.ej., polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como el medio oleoso, se emplean, p.ej., aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de este modo se carga preferentemente en una ampolla apropiada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para su uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (p.ej., ampollas, viales), supositorios, etc.

Usos terapéuticos de las moléculas de unión a antígeno

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

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

La reducción de la carga tumoral o la regresión tumoral incluye la desaparición parcial o completa de un tumor o tumores en un sujeto. Se entiende que la regresión tumoral representa una tendencia hacia una menor carga tumoral

o un estado de enfermedad menos grave. Como tal, la regresión es una disminución progresiva de la eliminación de tumores malignos medibles en el organismo, incluyendo disminución del tamaño del tumor y/o disminución del número de tumores. La reducción del desarrollo tumoral incluye una inhibición o supresión parcial o completa del crecimiento tumoral adicional o nuevo.

5 Las moléculas de unión a antígeno de la presente divulgación pueden usarse para tratar, p.ej., tumores primarios y/o metastásicos que surgen en el cerebro y las meninges, la orofaringe, el árbol pulmonar y bronquial, el tracto gastrointestinal, el sistema reproductor masculino y femenino, músculo, hueso, la piel y anejos cutáneos, tejido conectivo, bazo, sistema inmunitario, las células que forman la sangre y la médula ósea, el hígado y el sistema urinario, y órganos sensitivos especiales tales como el ojo. En determinados casos, Las moléculas de unión a antígeno
10 biespecíficas de la divulgación se usan para tratar uno o más de los siguientes cánceres: carcinoma de células renales, carcinoma de páncreas, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, gliomas malignos, osteosarcoma, cáncer colorrectal, cáncer gástrico (p.ej., cáncer gástrico con amplificación MET), mesotelioma maligno, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, sarcoma sinovial, cáncer de tiroides o melanoma. Según ciertos casos ejemplares, las moléculas de unión a antígeno
15 biespecíficas de la presente divulgación se usan para tratar un cáncer de linfocitos B (p.ej., linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin [NHL], leucemia/linfoma linfoblástico de linfocitos B precursores, neoplasias de linfocitos B maduros, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B/linfoma microlinfocítico, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma cutáneo del centro folicular, linfoma de linfocitos B de zona marginal, tricoleucemia, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo posterior a trasplante, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfoma anaplásico macrocelular.

25 Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas anti-CD3/anti-CD20 de la presente divulgación se administran en una cantidad suficiente para reducir la carga tumoral, producir regresión tumoral, inhibir el crecimiento tumoral o reducir el desarrollo tumoral en el sujeto. En algunos ejemplos de la divulgación, la cantidad administrada está entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg. En otros casos, la cantidad administrada es de aproximadamente 0,4 mg/kg. En otros casos, la cantidad administrada es de aproximadamente 0,04 mg/kg. En aún otros casos, la cantidad administrada es de aproximadamente 0,004 mg/kg.

30 Según ciertos casos de la presente divulgación, las moléculas de unión a antígeno son útiles para tratar a un paciente afectado por un linfoma de linfocitos B (p.ej., NHL) que es resistente o no responde de manera incompleta a la terapia anti-CD20 sola (p.ej., resistente a la terapia con rituximab). Según otros casos relacionados de la divulgación, se proporcionan métodos que comprenden administrar una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-
35 CD20 como se desvela en este documento a un paciente que padece un linfoma de linfocitos B (p.ej., NHL) que es refractario a la terapia anti-CD20 (p.ej., un paciente con un tumor refractario al rituximab o con linfoma de linfocitos B recidivante o refractario). Pueden usarse métodos analíticos/diagnósticos conocidos en la técnica, como exploración tumoral, etc., para determinar si un paciente alberga un tumor resistente a, responde de forma incompleta o es resistente al tratamiento anti-CD20 solo.

40 La presente divulgación también incluye métodos para tratar el cáncer residual en un sujeto. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "cáncer residual" significa la existencia o persistencia de una o más células cancerosas en un sujeto después de tratamiento con una terapia anticáncer.

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

55 **Terapias y formulaciones combinadas**

La presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los ejemplos de anticuerpos y moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas en este documento en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los ejemplos de agentes terapéuticos
60 adicionales que pueden combinarse o administrarse en combinación con una molécula de unión a antígeno de la presente divulgación incluyen, p.ej., un antagonista de EGFR (p.ej., un anticuerpo anti-EGFR [p.ej., cetuximab o panitumumab] o inhibidor de molécula pequeña de EGFR [p.ej., gefitinib o erlotinib]), un antagonista de otro miembro de la familia EGFR como Her2/ErbB2, ErbB3 o ErbB4 (p.ej., anticuerpo anti-ErbB2, anti-ErbB3 o anti-ErbB4 o inhibidor de molécula pequeña de ErbB2, ErbB3 o ErbB4), un antagonista de EGFRvIII (p.ej., un anticuerpo que se usa específicamente a EGFRvIII), un anagonista de cMET (p.ej., un anticuerpo anti-cMET), un antagonista de IGF1R (p.ej., un anticuerpo anti-IGF1R), un inhibidor de B-raf (p.ej., vemurafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX-4720), un inhibidor de

PDGFR- α (p.ej., un anticuerpo anti-PDGFR- α), un inhibidor de PDGFR- β (p.ej., un anticuerpo anti-PDGFR- β), un antagonista de VEGF (p.ej., una trampa de VEGF, véase, p.ej., el documento US 7087411 (también mencionado en este documento como "proteína de fusión inhibidora de VEGF"), anticuerpo anti-VEGF (p.ej., bevacizumab), un inhibidor de quinasa de molécula pequeña del receptor de VEGF (p.ej., sunitinib, sorafenib o pazopanib)), un antagonista de DLL4 (p.ej., un anticuerpo anti-DLL4 desvelado en US 2009/0142354), un antagonista de Ang2 (p.ej., un anticuerpo anti-Ang2 desvelado en US 2011/0027286 como H1H685P), un antagonista de FOLH1 (p.ej., un anticuerpo anti-FOLH1), un antagonista de PRLR (p.ej., un anticuerpo anti-PRLR), un antagonista de STEAP1 o STEAP2 (p.ej., un anticuerpo anti-STEAP1 o un anticuerpo anti-STEAP2), un antagonista de Tmprss2 (p.ej., un anticuerpo anti-Tmprss2), un antagonista de MSLN (p.ej., un anticuerpo anti-MSLN), un antagonista de CA9 (p.ej., un anticuerpo anti-CA9), un antagonista de uroplaquina (p.ej., un anticuerpo antiuroplaquina), un antagonista monovalente de CD20 (p.ej., un anticuerpo anti-CD20 monovalente como rituximab), etc. Otros agentes que pueden administrarse beneficiosamente en combinación con las moléculas de unión a antígeno de la divulgación incluyen inhibidores de citoquinas, incluyendo inhibidores de citocina de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 o a sus receptores respectivos. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación (p.ej., composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión a antígeno biespecífica anti-CD3/anti-CD20 como se desvela en este documento) también pueden administrarse como parte de un régimen terapéutico que comprende una o más combinaciones terapéuticas seleccionadas entre "ICE ": ifosfamida (p.ej., Ifex®), carboplatino (p.ej., Paraplatin®), etopósido (p.ej., Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": dexametasona (p.ej., Decadron®), citarabina (p.ej., Cytosar-U®, arabinósido de citosina, ara-C), cisplatino (p.ej., Platino®-AQ); y "ESHAP": etopósido (p.ej., Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), metilprednisolona (p.ej., Medrol®), dosis altas de citarabina, cisplatino (p.ej., Platino®-AQ).

La presente divulgación también incluye combinaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas de unión a antígeno mencionadas en este documento y un inhibidor de uno o más de VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, Tmprss2, MSLN, CA9, uroplaquina, o cualquiera de las citoquinas mencionadas anteriormente, en donde el inhibidor es un aptámero, una molécula antisentido, una ribozima, un ARNip, un pepticuerpo, un nanocuerpo o un fragmento de anticuerpo (p.ej., fragmento Fab; fragmento F(ab')₂; fragmento Fd; fragmento Fv; scFv; fragmento dAb; u otras moléculas genomanipuladas, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos y unidades de reconocimiento mínimas). Las moléculas de unión a antígeno de la divulgación también pueden administrarse y/o formularse conjuntamente en combinación con antivirales, antibióticos, analgésicos, corticosteroides y/o AINE. Las moléculas de unión a antígeno de la divulgación también pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento que también incluye tratamiento con radiación y/o quimioterapia convencional.

Los componentes terapéuticamente activos adicionales pueden administrarse justo antes de, simultáneamente con, o poco después de la administración de una molécula de unión a antígeno de la presente divulgación (para los fines de la presente divulgación, dichos regímenes de administración se consideran la administración de una molécula de unión a antígeno "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional).

La presente divulgación incluye composiciones farmacéuticas en donde una molécula de unión a antígeno de la presente divulgación se formula conjuntamente con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte del presente documento.

Regímenes de administración

Según ciertos casos de la presente divulgación, pueden administrarse dosis múltiples de una molécula de unión a antígeno (p.ej., un anticuerpo anti-CD3 o una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une específicamente a CD20 y CD3) a un sujeto durante un periodo de tiempo definido. Los métodos según este aspecto de la divulgación comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de una molécula de unión a antígeno de la divulgación. Tal como se utiliza en el presente documento, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de una molécula de unión a antígeno se administra al sujeto en un momento diferente, p.ej., en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (p.ej., horas, días, semanas o meses). La presente divulgación incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial única de una molécula de unión a antígeno, seguido de una o más dosis secundarias de la molécula de unión a antígeno, y opcionalmente seguido de una o más dosis terciarias de la molécula de unión a antígeno.

Las expresiones "dosis inicial", "dosis secundarias", y "dosis terciarias", se refieren a la secuencia temporal de administración de la molécula de unión a antígeno de la divulgación. Por tanto, la "dosis inicial" o "primera dosis" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también conocida como "dosis de referencia"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundaria y terciaria pueden contener la misma cantidad de la molécula de unión a antígeno, pero generalmente pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. En determinados casos, sin embargo, la cantidad de una molécula de unión a antígeno contenida en las dosis inicial, secundaria y/o terciaria varían entre sí (p.ej., ajustadas hacia arriba o hacia abajo según corresponda) durante el curso del tratamiento. En determinados casos, dos o más (p.ej., 2, 3, 4 o 5) dosis se administran al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguidas de dosis posteriores que se

administran con menos frecuencia (p.ej., "dosis de mantenimiento").

Se ha descubierto que la administración de una primera dosis, administrada a una concentración mínima, y después una dosis posterior o segunda, administrada en dos o tres veces la primera dosis, beneficiará al paciente

5 En algunos casos, una primera dosis de molécula de unión a antígeno se administra a un paciente consecutivamente durante un primer periodo de tiempo, y una segunda dosis posterior de dicha molécula de unión a antígeno se administra a un paciente consecutivamente durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis. En otros casos, la primera dosis se administra una vez por semana o dos veces por semana durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas. En otro caso, la segunda dosis se administra una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez al mes, o dos veces al mes durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas o meses.

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

20 Los métodos según este aspecto de la divulgación pueden comprender administrar a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de una molécula de unión a antígeno (p.ej., una molécula de unión a antígeno biespecífica que se une específicamente a CD20 y CD3). Por ejemplo, en determinados casos, solo se administra una dosis secundaria única al paciente. En otros casos, dos o más (p.ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias se administran al paciente. De manera análoga, en determinados casos, solo se administra una dosis terciaria única al paciente. En otros casos, dos o más (p.ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias se administran al paciente.

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

Usos de diagnóstico de los anticuerpos

40 Los anticuerpos anti-CD3xCD20 de la presente divulgación también pueden usarse para detectar y/o medir CD3, o células que expresan CD3 en una muestra, p.ej., con fines de diagnóstico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3xCD20, o fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión aberrante (p.ej., sobreexpresión, subexpresión, ausencia de expresión, etc.) de CD3. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para CD3 pueden comprender, p.ej., poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-CD3xCD20 de la divulgación, en donde el anticuerpo está marcado con una etiqueta detectable o molécula indicadora. Como alternativa, un anticuerpo anti-CD3xCD20 sin marcar puede usarse en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está marcado de manera detectable. El marcador detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I; un resto fluorescente o quimioluminiscente como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como una fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano rústico o luciferasa. Los ensayos ejemplares específicos que pueden usarse para detectar o medir CD3 en una muestra incluyen el ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

55 Los anticuerpos anti-CD3xCD20 de la presente divulgación también pueden usarse para detectar y/o medir células que expresan CD20 o CD20 en una muestra, o para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por una expresión anómala (p.ej., sobreexpresión, subexpresión, ausencia de expresión, etc.) de CD20, análogamente.

60 Las muestras que pueden usarse en ensayos de diagnóstico de CD3 o CD20 según la presente divulgación incluyen cualquier muestra de tejido o fluido obtenible de un paciente que contenga cantidades detectables de proteína CD3 y/o CD20, o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, Los niveles de CD3 o CD20 en una muestra particular obtenida de un paciente sano (p.ej., un paciente no afectado por una enfermedad o afección asociada con niveles o actividad anómalos de CD3 o CD20) se medirán para establecer inicialmente un nivel inicial o estándar, de CD3 o CD20. Este nivel inicial de CD3 o CD20 puede compararse contra los niveles de CD3 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una enfermedad o afección relacionada con CD3 o CD20, respectivamente.

65

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (p.ej., sumas, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

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

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

En los métodos pueden usarse ejemplos adicionales de anticuerpos anti-CD3, y la descripción de tales anticuerpos y las propiedades biológicas de tales anticuerpos anti-CD3 se describen en Solicitud Internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre, 2013 y publicada como WO2014/047231. Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 y las propiedades biológicas de dichos anticuerpos anti-CD20 se describen en US 7.879.984 y Solicitud Internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre, 2013 y publicada como WO2014/047231.

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

Los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR usadas para construir el grupo de unión a antígeno anti-CD3 y el grupo de unión a anti-CD20 de la divulgación de anticuerpos biespecíficos se exponen en la Tabla 1. Los identificadores de secuencia de ácidos nucleicos correspondientes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos (SEQ ID NOs)

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

Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NOs)

| Denominación del anticuerpo | SEQ ID NO: | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| Anti-CD20 | 1 | 3 | 5 | 7 | 18 | 20 | 22 | 24 |
| Anti-CD3 | 9 | 11 | 13 | 15 | 18 | 20 | 22 | 24 |

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 4: Identificadores de secuencia de ácidos nucleicos

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

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

Tabla 5: Identificadores de secuencia de aminoácidos de cadena pesada

| Identificador de Cadena Pesada | Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | Región Constante de Cadena Pesada (CH) |
|--------------------------------|---|-------|-------|-------|--|
| CD20-VH-CH-A | 2 | 4 | 6 | 8 | 26 o 28 o 30 o 32 |
| CD3-VH-CH-A | 10 | 12 | 14 | 16 | |

15 **Tabla 6: Identificadores de Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera**

| Identificador de Cadena Ligera | Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|--------------------------------|---|-------|-------|-------|
| CD3-VL-A | 18 | 20 | 22 | 24 |

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

20 **Tabla 7: Identificadores de Secuencia de Ácidos Nucleicos de Cadena Pesada**

| Identificador de Cadena Pesada | Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | Región Constante de Cadena Pesada (HCVR) |
|--------------------------------|---|-------|-------|-------|--|
| CD20-VH-A | 1 | 3 | 5 | 7 | 25 o 27 o 29 o 31 |
| CD3-VH-A | 9 | 11 | 13 | 15 | |

Tabla 8: Identificadores de Secuencia de Ácidos Nucleicos de Cadena Ligera

| Identificador de Cadena Ligera | Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|--------------------------------|---|-------|-------|-------|
| CD3-VL-A | 17 | 19 | 21 | 23 |

25 Además de los anticuerpos biespecíficos descritos anteriormente, los siguientes anticuerpos de control también se utilizaron en algunos de los experimentos expuestos en los siguientes ejemplos:

30 Anticuerpo de Control 1: Anticuerpo monoclonal "OKT-3" contra antígenos de superficie de linfocitos T humanos como se establece en US 4.361.549 y disponible del hibridoma CRL-8001 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA).

Anticuerpo de Control 2: Anticuerpo "SP34" reactivo contra la cadena épsilon del complejo T3 en linfocitos T

humanos, disponible en BD Pharmagen, Cat N.º 55052.

Anticuerpo de Control 3: Anticuerpo terapéutico anti-CD20, con secuencias de cadena pesada y ligera de Rituxan (Rituximab) como se desvela en US 5.736.137.

(Control) Anticuerpo 4: También conocido como anticuerpo CD3xCD20-Fc tipo silvestre (wtFc), este anticuerpo se fabricó de manera análoga a los métodos anteriores que tienen un grupo anti-CD20 que comprende un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 2/18 (secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 de SEQ ID NOs: 4-6-8-20-22-24), y una región CH de IgG1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 45); y un grupo anti-CD3 que comprende un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NOs: 10/18 (secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 de SEQ ID NOs: 12-14-16-20-22-24), y una región CH de IgG1 de tipo silvestre con 2 modificaciones de aminoácidos (SEQ ID NO: 48) en el dominio CH3 para facilitar el aislamiento. El anticuerpo CD3xCD20-wtFc (Anticuerpo 4) puede denominarse anticuerpo de control combinado que tiene un dominio Fc de IgG1 de tipo silvestre (es decir, emparejado con los dominios de unión a antígeno de los anticuerpos CD3xCD20-Fc quimérico de la divulgación), para comparar funciones efectoras de anticuerpos u otras propiedades, respecto a anticuerpos que tienen diferentes secuencias o estructura de dominio Fc.

Anticuerpo de Control 5: El anticuerpo monoclonal anti-FelD1 se une a un antígeno felino sin reactividad cruzada con CD20 o CD3 humano. Este control de anticuerpo no específico de IgG1 se obtuvo mediante métodos descritos en la Publicación PCT N.º WO2013/166236, publicada el 7 de noviembre, 2013.

Anticuerpo de Control 6: El dominio de unión a antígeno anti-FelD1 como se describe en la Publicación PCT N.º WO2013/166236 se diseñó como se describe en este documento para contener un dominio Fc de IgG4 quimérico de forma análoga a Ab 1. Control Ab 6 no tiene reactividad cruzada con CD20 o CD3 humano, pero tiene una función efectora similar a Ab 1.

Ejemplo 3. Construcción Quimérica de Cadena Pesada

La generación de las cadenas pesadas quiméricas, por ejemplo, CH de IgG4 quimérica (SEQ ID NO: 26) y un CH de IgG1 quimérica (SEQ ID NO: 30), se realizó usando técnicas de clonación estándar. Primero, el CH de IgG4 quimérica se generó mediante un proceso de amplificación por PCR de dos etapas. Dos fragmentos de PCR, Fragmento 1 y 2, se amplificaron usando una construcción de vector de partida pR001 que contiene un ADN del CH hlgG4 de tipo silvestre usando pares de cebadores que flanquean la región CH, P1-P2 y P3-P4, respectivamente. Ver Tabla 9 a continuación). Los cebadores introdujeron tanto la secuencia de bisagra inferior IgG2 deseada (que codifica SEQ ID NO: 52) como los sitios de restricción flanqueantes en los fragmentos. Estos dos fragmentos se unieron después usando los cebadores de PCR P2 y P4. La secuencia resultante se insertó en pR001 a través de sitios de restricción Xho1-Not1 generando una construcción vectorial pR002 que contiene CH de IgG4 quimérica que tiene una secuencia de bisagra inferior IgG2. La secuencia se confirmó usando los cebadores P10 y P11.

Además, se generó un CH de IgG1 quimérica mediante amplificación por PCR de múltiples etapas. El fragmento 1a se generó usando los cebadores P2 y P5 (véase la Tabla 9 a continuación) a partir del molde pR85503 (que contiene un ADN de CH de IgG1 humana de tipo silvestre). El fragmento 2a se amplificó con los cebadores P6 y P8 usando pR002 (que contiene el ADN de CH de IgG4 quimérica) como molde. El fragmento 3 se preparó usando los cebadores P7 y P9 del molde pR003 (ADN de CH de hlgG1 de tipo silvestre; SEQ ID NO: 45). Los fragmentos 1a y 2a se unieron usando los cebadores P2 y P8, que generó el Fragmento 4. La unión de los Fragmentos 2a y 3 usando los cebadores P6 y P9 creó el Fragmento 5. Los fragmentos 4 y 5 se fusionaron usando los cebadores P2 y P9. La secuencia resultante se insertó en pR001 a través de sitios de restricción Xho1-Not1 generando una construcción pR004 que tiene una región constante de IgG1 con la bisagra inferior IgG2 y el dominio CH2 de IgG4. La secuencia se confirmó usando los cebadores P10 y P11.

Tabla 9: Cebadores para generación por PCR de construcciones de ácido nucleico de C_H quimérico

| Nombre del cebador | Secuencia del Cebador (SEQ ID NO) |
|--------------------|--|
| P1 | 5'-TTCGCGCAGCTTAGGTTTATGCCAGGGGGGACGGGTGGCACGGGTCTGTTGGTGGACACCGT-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 63) |
| P2 | 5'-AAGCTTATACTCGAGCTCTAGATTGGGAACCCGGGTCTCT-3' (SEQ ID NO: 64) |
| P3 | 5'-CCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCATCAGTCTTCCCTGTTCCCCCAAAA-3' (SEQ ID NO: 65) |
| P4 | 5'-TGTGTCTTCAGGGAGAGGGACAGAGACCCATTTACTCGCC GGCG-3' (antisense) (SEQ ID NO: 66) |
| P5 | 5'-CTCGGGTTTAGAACACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCTGTTGGTGGACACCGT-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 67) |
| P6 | 5'-AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCACTGTG-3' (SEQ ID NO: 68) |
| P7 | 5'-GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC-3' (SEQ ID NO: 69) |

| | |
|-----|---|
| P8 | 5'-CTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTG GTGTCCACATGTGG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 70) |
| P9 | 5'-CTTCAGGGAGAGGGACAGAGGCCATTTACTCGCCGGCG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 71) |
| P10 | 5'-GCTGACAGACTAACAGACTG-3' (SEQ ID NO: 72) |
| P11 | 5'-ATACATTATACGAAGTTATACCGGTA-3' (SEQ ID NO: 73) |

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

- 5 El anticuerpo CD3xCD20-wtFc (Anticuerpo de Control 4) se comparó con los anticuerpos de Control monoespecíficos, como se establece en el Ejemplo 2, mediante un método de enlace FACS por su capacidad de unirse a Jurkat (CD3+, CD20 - línea de linfocitos T humanos), Raji (CD3-, CD20+ línea de linfocitos B humanos), o PBMC de cinomolgo ("células mKT").
- 10 Los datos de FACS se obtuvieron utilizando el siguiente protocolo: Las células a 2×10^5 por pocillo se incubaron con anticuerpos diluidos en serie durante 30 min en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron y las células secundarias apropiadas (células Jurkat, RAJI) o un cóctel de anticuerpos secundarios (para PBMC de cino) se añadieron y se incubaron durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS frío que contenía BSA al 1 % y se analizaron por citometría de flujo en un BD FACS Canto II.
- 15 Las células Jurkat y Raji se seleccionaron mediante dispersiones laterales y directas, mientras que los linfocitos T de cinomolgo también se seleccionaron en una población CD2+CD4+. Las CE₅₀ para titulación de unión celular se determinaron usando el software Prism con valores calculados usando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

20 **Tabla 10. Valores de unión de CE50 (Molar) para anticuerpos monoespecíficos frente a biespecíficos CD3xCD20**

| Anticuerpo | FACS - Jurkat | FACS - RAJI | FACS - células mKT |
|---|---------------|-------------|--------------------|
| Control 1 (anti-CD3) | 1,96E-10 | NB | NB |
| Control 2 (anti-CD3) | (+) | NB | 7,03E-11 |
| Control 3 (anti-CD20) | Sin unión | (+) | NB |
| Control 4 (Anti-CD3xCD20, CH de tipo silvestre) | 3,85E-08 | 5,99E-08 | 8,74E-06 |
| (+) valores de CE ₅₀ no determinados, pero se observa unión; NB sin unión; NT no probado | | | |

25 Tal como se muestra en la Tabla 10, el panel de anticuerpos probados mostró un rango de afinidades de unión en las diferentes líneas celulares, dependiendo de sus especificidades. El Anticuerpo de Control 4 Biespecífico mostró la capacidad de unir líneas diana tanto humanas como de cinomolgo. El Anticuerpo de Control 4 comprende las mismas regiones variables anti-CD3xCD20 con Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2, sin embargo tiene una región CH de IgG1 de tipo silvestre. Control 1 anti-CD3 (OKT3), Control 2 anti-CD3 (SP34) y Control 3 anti-CD20 unidos a Jurkat, linfocitos T de cinomolgo y RAJI, respectivamente.

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

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

40 Los ensayos de eliminación de calceína se realizaron utilizando el siguiente protocolo: Se aislaron PBMC humanas y de cinomolgo sobre placa de ficoll o con medios de separación de células de mamífero Lympholyte, respectivamente. Las PBMC aisladas se activaron durante un periodo de varios días con medios que contenían IL-2 humana recombinante (30 U/ml) y perlas de activación de linfocitos T (anti-CD3/CD28 para PBMC humanas, anti-CD2/CD3/CD28 para PBMC de cinomolgo).

45 Las células diana (Raji para destrucción mediada por CD20 y U937 para destrucción mediada por FcR) se marcaron con calceína, y se incubaron con linfocitos T activados en una relación efector:diana de 10:1 utilizando diluciones en serie de anticuerpos 3 veces en un curso de 3 horas a 37 °C. Después de incubación, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de fondo transparente negro translúcido para análisis de fluorescencia. Las CE₅₀ definidas como la concentración molar de anticuerpo biespecífico que induce una citotoxicidad del 50 % se determinó usando Prism. Los valores se calcularon utilizando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 11. Valores de CE₅₀ para citotoxicidad inducida por CD20 x CD3 para células de Raji y U937

| Anticuerpo | Linfocitos T Humanos Citotoxicidad para Raji [M] | Linfocitos T de Mono Citotoxicidad para Raji [M] | Linfocitos T Humanos Citotoxicidad para U937 [M] |
|---------------------------------|---|---|---|
| Ab 1 de Control (anti-CD3) | NA | NA | 3,04E-12 |
| Ab 4 de Control (Anti-CD3xCD20) | 5,63E-11* | 1,27E-12* | 8,86E-11* |

(*) Los datos son valores medios de 3 o más ensayos independientes. Los datos sin un (*) son valores representativos/promedio de 1 o 2 ensayos independientes. NA = Sin Actividad

Como se muestra en la Tabla 11, el anticuerpo biespecífico CD20 x CD3 que contiene grupos anti-CD3 reactivos cruzados específicos para humanos y cinomolgos, y una región CH de IgG1 de tipo silvestre, pudo redirigir específicamente la citotoxicidad a células de Raji en presencia de linfocitos T activados en humanos. En presencia de linfocitos T activados por cinomolgos, Raji se destruyeron cuando se incubaron con el anticuerpo Ab 4 de Control biespecífico que tiene un grupo anti-CD3 que activa linfocitos T de mono. Tanto el anticuerpo biespecífico como el Ab 1 de Control (mAb anti-CD3) mostraron actividad en el ensayo de destrucción dependiente de Fc/FcR U937. Esta actividad podría bloquearse mediante la adición de bloqueo de IgG humana no específica a la reacción (datos no mostrados).

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

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

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

El porcentaje de citotoxicidad se calculó utilizando la ecuación:
 $\% \text{ de citotoxicidad} = ((L_s - L_{SR}) / (L_{MR} - L_{SR})) * 100 \%$ donde L_{SR} es el valor inicial de luminiscencia de la célula diana de referencia y L_{MR} es la liberación máxima de calceína de las células lisadas con digitonina. La CE₅₀ para citotoxicidad se determinó usando el software Prism (GraphPad). Los valores se calcularon utilizando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros y se muestran en Tabla 12 y Figuras 5A y 5B.

La actividad CDC del Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 contra células de Daudi y Raji disminuye significativamente en comparación con el anticuerpo correspondiente que tiene una región constante de cadena pesada en peso. Ver Tabla 12 y Figuras 5A/B. Se observó cierta actividad CDC con el Anticuerpo 1 contra células de Raji, sin embargo, los resultados globales muestran que los anticuerpos quiméricos tienen respuestas efectoras más débiles que los anticuerpos de control de Fc de IgG1 wt.

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

| Cél. Diana → | CDC | | | |
|-----------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| | Daudi | | Raji | |
| | CE ₅₀ [M] | Citotoxicidad Máxima (%) | CE ₅₀ [M] | Citotoxicidad Máxima (%) |
| Ab 4 de Control | 6,12E-08 | ~ 95 | 1,98E-08 | ~ 85 |
| Ab 1 | NA | NA | 2,86E-08 | ~ 45 |
| Ab 2 | NA | NA | 3,49E-08 | ~ 10 |

NA: Sin actividad

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

Para examinar el efecto de Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 frente a anticuerpo biespecífico con regiones CH de tipo silvestre (y regiones variables idénticas) sobre la función efectora de ADCC, los linfocitos NK positivos para CD56 no estimulados recientemente aislados o las células NK92 diseñadas para expresar el alelo V de mayor afinidad de FcγRIIIa se sembraron en placas con células de Raji o Daudi CD20 positivas marcadas con calceína en presencia de anticuerpos quiméricos CH (Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2) y anticuerpo de control wt-CH (Anticuerpo de Control 4). La liberación de calceína de células diana se monitorizó y el porcentaje de citotoxicidad se determinó. El porcentaje de citotoxicidad y CE₅₀ se calcularon como se describió para el ensayo CDC, anteriormente. Los resultados se muestran en Tabla 13 y en Figuras 6A y 6B.

Los anticuerpos quiméricos CH, Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2, no median la actividad ADCC (Tabla 13) contra células de Raji o Daudi.

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

| ADCC | | | | |
|-----------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|
| Célula Diana→ | Daudi | | Raji | |
| | CE50 [M] | Citotoxicidad Máxima (%) | CE50 [M] | Citotoxicidad Máxima (%) |
| Ab 4 de Control | 1,87E-10 | ~ 70 [#] | 1,48E-09 | ~ 65 [#] |
| Ab 1 | NA | NA | NA | NA |
| Ab 2 | NA | NA | NA | NA |

NA: Sin actividad; #: citotoxicidad de fondo -20 %

Ejemplo 8-Afinidades de unión derivadas de resonancia de plasmón superficial y constantes cinéticas de anticuerpos quiméricos

Los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 x anti-CD20 que tienen Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 con regiones quiméricas constantes de cadena pesada se analizaron usando la tecnología de Resonancia de Plasmón de Superficial (SPR) (Biacore) para determinar sus parámetros de unión cinética a receptores Fcγ humanos y de cinomolgo. Los controles de isotipo, en particular control de isotipo wt-IgG1 y control de isotipo wt-IgG4 CPPC, se probaron de manera similar.

En resumen, los experimentos SPR se realizaron a 25 °C en un instrumento Biacore T200 que emplea un chip recubierto con carboximetildextrano (CM-5). Un anticuerpo monoclonal de ratón anti-penta-histidina (GE Healthcare) se inmovilizó en la superficie del chip sensor CM-5 usando química estándar de acoplamiento de amina. 140RU-376RU de proteínas de FcγR humanas o de mono marcadas con His se capturaron en el chip CM-5 anti-penta-histidina acoplado a amina y se inyectaron soluciones madre de anticuerpos a 20 μl/min durante 2,5 minutos sobre las proteínas capturadas. La respuesta de unión a mAb se controló y, para receptores de baja afinidad, se calculó el equilibrio de unión en estado estacionario. Las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinéticas se determinaron procesando y ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático de ajuste de curvas Scrubber 2.0. Las constantes en equilibrio de disociación de unión (K_D) y las semividas disociativas (t_{1/2}) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinéticas como: K_D (M) = k_d / k_a; y t_{1/2} (min) = (ln2)/(60*k_d).

Tabla 14: Parámetros de unión cinética para anticuerpos de cadena pesada quiméricos y de tipo silvestre (wt)

| Unión a FcγRI humano capturado por His a 25 °C | | | | |
|--|---|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Anticuerpo | k _a (M ⁻¹ s ⁻¹) | k _d (s ⁻¹) | K _D (10 ⁻⁹ M) | T ^{1/2} (min) |
| wt-IgG1 Control de Isotipo | 1,74E+05 | 7,48E-04 | 4,3 | 15 |
| wt-IgG4 CPPC Control de Isotipo | 1,71E+05 | 2,36E-03 | 13,9 | 5 |
| Ab 1 | NB | NB | NB | NB |
| Ab 2 | NB | NB | NB | NB |

NB: No se detectó unión

Como demuestran los resultados en la Tabla 14, Los anticuerpos biespecíficos Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2 no muestran unión a FcγRI humano, en comparación con los anticuerpos que tienen la región de hlgG1 o CH de hlgG4-CPPC de tipo silvestre, en el ensayo SPR. Los anticuerpos biespecíficos quiméricos de cadena pesada de esta divulgación también muestran una unión débil o nula para varios de los receptores FcRγ humanos de baja afinidad (p.ej., unión débil en FcRγIIA humano, FcRγIIB, y no se detectó unión en FcRγI humano, FcRγIIIA o FcRγIIIB) en comparación con anticuerpos con la secuencia wt hlgG1 o hlgG4-CPPC Fc (Tabla 15, a continuación).

Tabla 15: Unión de equilibrio en estado estacionario para anticuerpos de cadena pesada quimérica y de tipo silvestre (wt) Unión a receptores de Fc/R humanos y de cinomolgo de baja afinidad capturados por His a 25 °C

| Anticuerpo Probado | K _D (10 ⁻⁶ M) Valores para unión de FcγR de baja afinidad a anticuerpos quiméricos de cadena pesada | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---|-----------------------|-----------------|-------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | hFcγRIIA humano (H131) | FcγRIIA humano (R131) | FcγRIIA de cino | FcγRIIB de humano | FcγRIIB de cino | FcγRIIA de humano (V176) | FcγRIIA de humano (F176) | FcγRIIA de cino | FcγRIIB de humano | FcγRIIB de cino |
| Control de Isotipo wtIgG1 | 1,1 | 2 | 4,2 | 2 | 4,2 | 1,5 | 1,3 | 0,6 | | |
| Control de Isotipo wtIgG4 (CPPC) | 12 | 10 | 19,3 | 9,8 | 9,6 | 10 | 26 | 5,8 | | |
| Ab 1 | 12 | 19,3 | 23,1 | 123 | 13,9 | NB | NB | 66,3 | | |
| Ab 2 | 11,7 | 20,5 | 23,5 | 233 | 14,6 | NB | NB | 42,4 | | |

NB: No se detectó unión

Ejemplo 9 Perfil farmacocinético de anticuerpos quiméricos

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

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

| Parámetro | Unidades | 1 mg/kg | | 1 mg/kg | |
|-------------------------------|-----------------|---------|------|---------|------|
| | | Ab 2 | | Ab 1 | |
| | | Media | DE | Media | DE |
| $C_{m\acute{a}x}$ | µg/ml | 33,4 | 3,79 | 26,0 | 4,72 |
| $C_{m\acute{a}x}/Dosis$ | kg*µg/ml/mg | 33,4 | 3,79 | 26,0 | 4,72 |
| $t_{m\acute{a}x}$ | día | 0,0243 | 0 | 0,0243 | 0 |
| AUC _{0-168 h} | día.µg/ml | 100 | 20,1 | 61,1 | 8,04 |
| AUC _{0-168 h}/Dosis} | día*kg*ug/ml/mg | 100 | 20,1 | 61,1 | 8,04 |
| T1/2 | Día | 8,14 | 1,15 | 14,0 | 2,64 |

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

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

Para determinar la potencia *in vivo* de la administración de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 de Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 de control, los cambios en los niveles de linfocitos B CD20+ en sangre periférica de monos cinomolgos se examinaron mediante FACS después de administración del anticuerpo biespecífico anti-CD3xCD20 en comparación con anticuerpo anti-CD20 mono-específico (Ab 3 de Control). El estudio se realizó en monos cinomolgos machos (*Macaca fascicularis*) organizados en ocho grupos de dosificación de 3 animales por grupo de dosificación como sigue: Grupo 1 fue el grupo de placebo (administración de control del vehículo); Grupo 2 recibió anticuerpo mono-específico (Ab 3 de Control; rituxan) a 30 mg/kg (30 mg/kg en mono es equivalente a la dosis humana de 375 mg/m² que se considera una dosis clínica máxima); Grupo 3 es el Anticuerpo 4 de Control biespecífico CD3xCD20 a 0,01 mg/kg; Grupo 4: Anticuerpo 4 a 0,1 mg/kg; Grupo 5 - Anticuerpo 4 a 1 mg/kg; Grupo 6 - Anticuerpo 1 a 0,01 mg/kg; Grupo 7 - Anticuerpo 1 a 0,1 mg/kg; y Grupo 8 - Anticuerpo 1 a 1 mg/kg. Se extrajo sangre el día -7 y el día -4 antes de la dosificación de los animales. Las dosis de fármaco o vehículo de anticuerpo (placebo) se administraron mediante infusión i.v. y se extrajo sangre a 2, 4 y 7 días después de la dosificación. Las muestras de sangre fueron analizadas por FACS para linfocitos B (CD20; Tabla 17) y marcadores de linfocitos T (CD3, véase a continuación) y el número absoluto de estos tipos de células se determinó.

En resumen, se incubaron 100 µl de sangre con 1,5 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos en tubos Eppendorf durante tres minutos. Las células se centrifugaron durante cinco minutos a 0,4xg, se lavaron 2x con lavado FACS (PBS + FBS al 3 %) y se bloquearon durante 10 minutos a temperatura ambiente con reactivo de bloqueo Fc. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos directamente conjugados a hCD45 y reactivos fluorescentes CD20. La determinación cuantitativa de subconjuntos de linfocitos B (CD20) o subconjuntos de linfocitos T (CD3) se realizó primero utilizando una estrategia de activación heterogénea que consistía en la tinción fluorescente CD45 y la demarcación de la característica de dispersión lateral (SSC) (CD45brightSSCdim) para delinear las poblaciones de glóbulos blancos (WBC). Después las poblaciones de linfocitos B se identificaron mediante el uso de anticuerpos relevantes marcados con fluorescencia (CD20 APC-Cy7). Después de la coloración, las células se lavaron dos veces antes de la adquisición de FACS mediante un citómetro FACSCanto y se analizaron con el software FlowJo. Los resultados se muestran en Tabla 17 y en Figuras 11A y 11B.

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

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

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

10 Los niveles de linfocitos T (CD3+) también se monitorizaron en este experimento mediante anticuerpos anti-CD3 marcados con fluorescencia. Se observó una pérdida transitoria de linfocitos T circulantes el día 2 después de la dosis en las cohortes de anticuerpos biespecíficos (Ab 4 y Ab 1; todas las dosis). No se observó pérdida de linfocitos T (por debajo del valor inicial) en los grupos de Control (Placebo) de Vehículo o Ab 3 de Control (Rituxan) en los momentos medidos. Los niveles de linfocitos T volvieron a los niveles iniciales en las cohortes de anticuerpos biespecíficos en el momento del día 4 y se mantuvieron en los niveles iniciales hasta el final del experimento (ver Figura 11B).

15 La potencia *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 de Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 se midió en sangre periférica de monos cinomolgos en un estudio a largo plazo (3 meses) que midió los cambios en los niveles de linfocitos B CD20+ o niveles de linfocitos T CD3+, análogamente al estudio descrito anteriormente. Placebo (vehículo) o anticuerpos biespecíficos se administraron a 1,0 mg/kg el Día 0. Los niveles de linfocitos B en sangre periférica se redujeron significativamente en el día 2 en ambas cohortes de anticuerpos biespecíficos y los niveles permanecieron empobrecidos durante la duración del estudio en todas las muestras excepto el placebo (ver Fig. 12A). Se observó una pérdida transitoria de linfocitos T el día 2 en las cohortes biespecíficas, después, los linfocitos T se recuperaron a los niveles iniciales en el día 4 y permanecieron alrededor del valor inicial según se midió durante todo el estudio (> 20 80 días) para los animales tratados con anticuerpos biespecíficos (Fig. 12B). No se observó pérdida transitoria de linfocitos T en animales tratados con placebo.

30 Para medir además la potencia *in vivo* del anticuerpo biespecífico CD3xCD20 Anticuerpo 1 y Anticuerpo 4 a dosis bajas de administración, los cambios en los niveles de linfocitos B CD20+ o los niveles de linfocitos T CD3+ se midieron en sangre periférica de monos cinomolgos en un estudio a largo plazo (2 meses), análogamente a los experimentos

anteriores. Los anticuerpos biespecíficos se administraron a 0,01 mg/kg o 0,001 mg/kg (1 µg/kg) el Día 0. Los niveles de linfocitos B en sangre periférica se empobrecieron significativamente el día 2 y los niveles permanecieron empobrecidos durante el periodo del estudio para ambas cohortes CD3xCD20 (Fig. 13A), similar a la observada en animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (como se observa en Tabla 17 y Figuras 11A o 12A). Los animales tratados con dosis muy bajas (1 µg/kg) de anticuerpos biespecíficos experimentan la misma pérdida transitoria de linfocitos T y recuperación que la observada en animales tratados con dosis más altas de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 (ver Fig. 13B en comparación con Figuras 11B o 12B).

La pérdida de linfocitos B como se observó en los estudios descritos se correlacionó con la pérdida de anticuerpos circulantes en sangre periférica de animales tratados con CD3xCD20-Fc quimérico Anticuerpo 1 (ver Figura 14). Como la exposición de anticuerpos en la circulación de animales se empobrece con el tiempo, las poblaciones de linfocitos B comienzan a recuperarse (p.ej., como se observó en el día 81 para el animal no. 106881).

La correlación de la pérdida de linfocitos B con la pérdida de anticuerpos circulantes en la sangre periférica también se observó en animales tratados con CD3xCD20-Fc quimérico Anticuerpo 2 (ver Figura 15), mientras que la exposición de anticuerpos en la circulación de animales se empobrece con el tiempo, entonces las poblaciones de linfocitos B comienzan a recuperarse, p.ej., como se observó en el día 66 para el animal no. I06876, y en el día 68 para el animal no. I06877. También se observó una correlación similar en animales tratados con el anticuerpo biespecífico CD3xCD20-wtFc (Ab 4) (ver Figura 16). Como la exposición de anticuerpos en la circulación de animales se empobrece con el tiempo, Las poblaciones de linfocitos B comienzan a recuperarse (ver Figura 16, p.ej., como se observó el día 91 para el animal no. I06870, y el día 64 para el animal no. I06872).

Ejemplo 11. Los anticuerpos biespecíficos CD3 x CD20 pueden empobrecer los linfocitos B CD20+ en tejidos linfoides de monos cinomolgos con dosis más bajas que los anticuerpos mono-específicos

Los cambios en los niveles de linfocitos B CD20+ en tejidos linfoides de monos cinomolgos se examinaron mediante FACS después de administración del anticuerpo biespecífico anti-CD3xCD20 (Anticuerpo 1 o Anticuerpo 4) en comparación con el anticuerpo anti-CD20 mono-específico (Ab 3 de Control- Rituxan). El estudio se realizó en monos cinomolgos macho (*Macaca fascicularis*) organizados en ocho grupos de dosificación de 3 animales por grupo de dosificación como flujos, análogamente a los Grupos 1-8 como se describió en el Ejemplo 10, anteriormente. Las dosis de fármaco o vehículo de anticuerpo se administraron mediante infusión i.v. y los animales se sacrificaron y los tejidos se recogieron a los 7 días después de la administración. Las muestras de tejido se analizaron mediante FACS para glóbulos blancos (CD45+), y específicamente linfocitos B (CD20+), marcadores, entonces se determinó el % de volumen de linfocitos B.

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

Tabla 18: Porcentaje de células CD20 positivas en ganglios linfáticos mesentéricos y bazo de mono después de tratamiento

| Tratamiento | N.º ID del Animal | Ganglios Linfáticos Mesentéricos | Bazo |
|--------------------|-------------------|----------------------------------|-------|
| | | Día 7 | Día 7 |
| Placebo | 78 | 38,14 | 63,22 |
| | 79 | 38,57 | 62,79 |
| | 80 | 37,36 | 49,17 |
| Ab 3 de Control | 81 | 6,21 | 4,5 |
| | 82 | 10,3 | 3,45 |
| | 83 | 4,21 | 2,18 |
| Ab 4 0,01 mg/kg | 84 | 13,43 | 3,14 |
| | 85 | 6,88 | 2,27 |
| | 86 | 10,78 | 1,39 |
| Ab 4 0,1 mg/kg | 87 | 1,51 | 2,37 |
| | 88 | 0,45 | 1,65 |
| | 89 | 1,24 | 2,4 |
| Ab 4 1 mg/kg | 90 | 0,63 | 0,97 |
| | 91 | 0,62 | 1,93 |
| | 92 | 1,08 | 1,22 |
| Ab 1 | 93 | 5,38 | 1,22 |

(continuación)

| | | Ganglios Linfáticos Mesentéricos | Bazo |
|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------|
| Tratamiento | N.º ID del Animal | Día 7 | Día 7 |
| 0,01 mg/kg | 94 | 6,37 | 1,89 |
| | 95 | 13,25 | 6,99 |
| Ab 1 0,1 mg/kg | 96 | 0,43 | 1,55 |
| | 97 | 0,68 | 1,75 |
| Ab 1 1 mg/kg | 98 | 2,36 | 2,97 |
| | 99 | 0,33 | 1,79 |
| | 00 | 1,6 | 1,71 |
| | 01 | 0,5 | 1,21 |

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

10 Como se muestra en Tabla 18 y Figura 17B, la administración de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 en comparación con el anticuerpo mono específico anti-CD20 dio como resultado empobrecimiento de linfocitos B de tejido en ganglios linfáticos mesentéricos a dosis mucho más bajas (dosis de 0,01 a 1,0 mg/kg) para las cohortes biespecíficas, con la dosis de 0,1 mg/kg y la dosis de 1 mg/kg de anticuerpo biespecífico dando como resultado empobrecimiento de linfocitos B más eficaz que en la cohorte mono específica. Este empobrecimiento no se observó en la cohorte de animales control con placebo.

15 **Ejemplo 12. Tratamiento tumoral con anticuerpo biespecífico CD3 x CD20**

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

20 Para evaluar la eficacia de determinados anticuerpos biespecíficos anti-CD3xCD20 en la reducción del crecimiento tumoral Raji, ratones NSG (ratones NOD/LtSz-scid/IL2Ry^{nu1o}) adquiridos en Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EE.UU.) fueron coimplantados por vía subcutánea con 2×10^6 células tumorales Raji y 5×10^5 PBMC humanas (Día 0). El mismo día, los ratones fueron tratados con una dosis intraperitoneal de 0,4, 0,04 o 0,004 mg/kg por ratón (N = 5 ratones por grupo de tratamiento) de Anticuerpo 1, o Anticuerpo de Control 5 (un anticuerpo de IgG1 para una diana irrelevante), o Control de Vehículo. Comenzando el Día 0, los ratones fueron tratados dos veces por semana con una dosis intraperitoneal de fármaco o vehículo durante el resto del estudio. El tamaño tumoral se midió dos veces por semana usando calibradores, y el volumen tumoral se calculó como Volumen = (longitud x anchura²)/2. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (versión Macintosh).

30 La significación estadística se determinó mediante ANOVA bilateral con comparaciones múltiples de Tukey después del ensayo. Los datos de cada una de las lecturas se compararon entre grupos de tratamiento. Un umbral de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los resultados se muestran en Figuras 7A-7F. Estos resultados muestran que Anticuerpo 1 (CD3xCD20-Fc quimérico) se dirige a tumores Raji en ratones que tienen células inmunes humanas coimplantadas, dando como resultado la supresión completa del crecimiento tumoral a las dosis probadas (FIG. 7C: 0,4 mg/kg de Ab1; FIG. 7E: 0,04 mg/kg de Ab1; FIG. 7F: 0,004 mg/kg de Ab1). Este ejemplo demuestra que el tratamiento con Anticuerpo 1 biespecífico CD3xCD20 fue eficaz para inhibir el crecimiento tumoral a partir del momento de la implantación del tumor. El crecimiento del tumor Raji permaneció completamente suprimido hasta 23 días después de la implantación en ratones que recibieron dosis de 0,4, 0,04 o 0,004 mg/kg de Anticuerpo 1, en relación con el control. También se observó que ni el Anticuerpo 1 ni el Anticuerpo de Control tuvieron un efecto significativo en el peso corporal del ratón durante el estudio (datos no mostrados).

40 El efecto antitumoral de los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 se probó adicionalmente en un modelo de ratón NSG similar (como se describió anteriormente), sin embargo, cada ratón NSG se dosificó con 1 mg de IgG de ratón (Fc de mIgG2a) el Día -1, y una vez por semana desde entonces. Los resultados se muestran en Figuras 8A-8B.

45 Este experimento demuestra que el tratamiento con Anticuerpo 1 biespecífico CD3xCD20 (CD3xCD20-Fc quimérico) o con Anticuerpo 4 biespecífico CD3xCD20 (CD3xCD20-wtFc) fue eficaz para inhibir el crecimiento tumoral a partir del momento de la implantación del tumor a las dosis de Ab biespecífico analizadas en presencia de IgG circulante (Figuras 8A-8B). Como se ve en Fig. 8A, el Anticuerpo 1 (anticuerpo biespecífico CD3xCD20-Fc quimérico) demuestra la inhibición completa del crecimiento tumoral durante el periodo de tiempo probado con o sin suplementación con IgG en este experimento.

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

Se evaluó la eficacia de anticuerpos biespecíficos anti-CD3xCD20 seleccionados en la reducción de tumores establecidos en ratones NSG. Los ratones NSG (ratones NOD/LtSz-scid/IL2Ry^{nu1o}) se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EE.UU.) y se implantaron por vía subcutánea con células tumorales Raji compatibles con HLA (2x10⁶) y PBMC humanas (5x10⁵) (Día -15). Se permitió que los tumores se establecieran en el hospedador durante 15 días antes del tratamiento. Un día antes de la administración del fármaco (Día -1), los ratones recibieron dosis de suplementos de 5 mg de Fc de mlgG2a. Los ratones se dosificaron posteriormente con Fc de mlgG2a a 5 mg por ratón una vez por semana durante el periodo del experimento (Día 7, Día 14, etc.). Los ratones se separaron en 2 grupos experimentales antes de administrar el fármaco según el tamaño tumoral: Grupo 1: -200-400 mm³ o Grupo 2: -500-900 mm³.

Después del tratamiento farmacológico, en tamaño tumoral se monitorizó y registró en cada ratón el Día 0, 3, 6, 10, 14, 17, 21 y 28. El tamaño tumoral se midió dos veces por semana usando calibradores, y el volumen tumoral se calculó como Volumen = (longitud x anchura²)/2. La presencia de tumores también se determinó por palpación. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (versión Macintosh). Los datos de cada una de las lecturas se compararon entre grupos de tratamiento. Los resultados se muestran en Figuras 9 y 10.

a. Grupo 1: tumores de -200-400 mm³. Desde el Día 0, varias cohortes de 4 o 5 ratones cada una fueron tratadas con la dosis indicada de fármaco o vehículo una vez por semana (es decir, Día 7, Día 14, etc.) como sigue:

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

b. Grupo 2: tumores de -500-900 mm³. Desde el Día 0, varias cohortes de 4 ratones cada una fueron tratadas con la dosis indicada del fármaco una vez por semana (es decir, Día 7, Día 14, etc.) como sigue:

- i. Anticuerpo 5 de Control, 0,4 mg/kg
- ii. Anticuerpo 1 (CD20xCD3-Fc quimérico), 0,4 mg/kg

Los tumores retrocedieron completamente en la cohorte administrada con 0,4 mg/kg de Anticuerpo 1 (CD20xCD3-Fc quimérico) durante 14 días. Ver Figura 9.

En el modelo con tumores establecidos más grandes (es decir, Grupo 2, -500-900 mm³), el tratamiento con Anticuerpo 1 (CD20xCD3-Fc quimérico) (0,4 mg/kg) dio como resultado la ablación completa de los tumores observados en ratones en 21 días. Ver Figura 10.

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

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

Los datos de proliferación se obtuvieron utilizando el siguiente protocolo: PBMC derivadas de humano o mono cinomolgo (5x10⁵/pocillo) se incubaron con diluciones en serie de anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 o anticuerpo de control y anticuerpo comercial anti-CD28 (humano: 200 ng/ml, cino: 500 ng/ml) durante 72 horas a 37 °C. Las células se cuantificaron usando Cell Titer Glo® y se midió la luminiscencia a medida que se leía la viabilidad celular usando un lector de placas de múltiples etiquetas VICTOR X5 (PerkinElmer) para detectar células vivas. La viabilidad celular (inducción doble de células estimuladas frente a células no estimuladas) se determinó dividiendo la luminiscencia de las células estimuladas entre la luminiscencia inicial de las células no estimuladas y se representaron utilizando el software Prism. Los resultados se resumen en Tabla 19 y Figuras 18A y 18B.

Tabla 19. CE₅₀ para proliferación de PBMC humanas y de cinomolgo inducida por anticuerpos biespecíficos anti-CD3x CD20

| Anticuerpo | Proliferación de PBMC Humana CE ₅₀ [M] | Proliferación de PBMC de Cino CE ₅₀ [M] |
|----------------------|---|--|
| Ab 5 de Control | NA | NA |
| CD3xCD20-wtFc (Ab 4) | 8,427E-12 | 3,325E-11 |
| Anticuerpo 1 | 1,163E-10 | 1,275E-11 |

Los datos son valores medios de 3 o más ensayos independientes. NA = sin actividad.

Como se muestra en Tabla 19 y Figuras 18A-18B, ambos anticuerpos biespecíficos CD20 x CD3 indujeron

proliferación de PBMC humanas o de cinomolgos. El Anticuerpo 1 indujo proliferación tanto de PBMC humanas como de cinomolgos con una potencia aproximadamente igual. Ab 5 de Control no exhibió actividad.

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

5 Se aislaron PBMC humanas o de cinomolgo sobre Ficoll-Paque o usando medios de separación de células de mamífero Lympholyte, respectivamente. PBMC aisladas (1x10⁶ células/ml de PBMC humanas o 5x10⁶ células/ml de PBMC de cinomolgos) se activaron durante 7 y 21 días, respectivamente, en medios completos (RPMI suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, estreptomycin 100 µg/ml, 292 µg/ml de L-glutamina) que contenía IL-2
10 humana recombinante (30 U/ml para PBMC humanas, 100 U/ml para PBMC de cinomolgos) y perlas de activación de linfocitos T (anti-CD3/CD28 para PBMC humanas, anti-CD2/CD3/CD28 para PBMC de cinomolgos). Las células de Raji que expresan CD20 (2x10⁶ células/ml) se marcaron con 8 µM de Calceína-AM durante 30 minutos a 37 °C y se lavaron 3 veces con medio. Las células diana marcadas con calceína (10.000-20.000 células/pocillo) se sembraron en placas en 200 µl con linfocitos T activados (relación efector/célula diana 10:1) y diluciones en serie del Anticuerpo 1,
15 Ab 4 o Ab 5 de Control (rango de concentración en humanos: 2 nM a 0,00003 nM; rango de concentración en cinomolgos: 6,6 nM a 0,002 pM) en medio completo durante 2 horas a 37 °C. Después de incubación, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de fondo transparente negro translúcido para análisis de fluorescencia. El porcentaje de citotoxicidad se calculó utilizando la ecuación:

20
$$\% \text{ de citotoxicidad} = ((FS - FSR)/(FMR-FSR))*100 \%,$$

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

25 La CE₅₀ de viabilidad celular (cuantificación catalizada por ATP) se determinó utilizando el software Prism. La lisis celular (citotoxicidad) se midió mediante liberación de calceína como una fracción de liberación máxima. El porcentaje de citotoxicidad celular se calculó como liberación observada en comparación con liberación máxima y valores de CE₅₀ determinados. Los resultados se muestran en Tabla 20 y en Figuras 19A (linfocitos T humanos) y 19B (linfocitos T de mono).

30

Tabla 20. Valores de CE₅₀ para citotoxicidad inducida por CD3xCD20 en células de Raji

| Anticuerpo | Linfocitos T humanos activados por citotoxicidad de Raji [M] | Linfocitos T de mono activados por citotoxicidad de Raji [M] |
|----------------------|--|--|
| Ab 5 de Control | NA | NP |
| CD3xCD20-wtFc (Ab 4) | 1,571E-11 | 1,730E-12 |
| Anticuerpo 1 | 2,503E-11 | 9,104E-12 |

NA = Sin actividad; NT = No probado.

35 Como se muestra en la Tabla 20, el Anticuerpo 1 medió la destrucción de células diana con valores de CE₅₀ representativos de 25,0 pM y 9,10 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. La destrucción de células diana mediada por el anticuerpo 4 con valores de CE₅₀ representativos de 15,7 pM y 1,73 pM para linfocitos T humanos (Figura 19A) y de cinomolgo (Figura 19B), respectivamente. No se observó actividad del control.

40 Para controlar la destrucción específica de células diana con CD20 mediante citometría de flujo, células de mieloma murino parental B16F10.9 (que no expresan CD20) y linfocitos B16F10.9 diseñados para expresar de manera estable CD20 humano (B16F10.9/CD20) se marcaron con 1 µM de colorantes fluorescentes de rastreo de éster de succinimidilo de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) y Rastreador de Células Violetas, respectivamente. Después del etiquetado, las células se mezclaron en una relación 1:1 y se sembraron en placas durante una noche a 37 °C. Por separado, Las PBMC humanas se sembraron en placas en medio RPMI suplementado a 1x10⁶ células/ml
45 y se incubaron durante la noche a 37 °C para enriquecer los linfocitos mediante empobrecimiento de macrófagos adherentes, células dendríticas y algunos monocitos. Al día siguiente, las células diana se incubaron conjuntamente con PBMC sin tratamiento empobrecida en células adherentes (relación célula Efector/Diana 4:1) y una dilución en serie de anticuerpos biespecíficos de ensayo CD3xCD20 o Anticuerpos 5 de Control de IgG1 (intervalo de concentraciones: 66,7 nM a 0,25 pM) durante 48 horas a 37 °C. Las células se eliminaron de las placas de cultivo celular utilizando un tampón de disociación celular libre de enzimas y se analizaron mediante FACS. Para análisis FACS, las células se tiñeron con un rastreador de glóbulos rojos muertos/vivos (Invitrogen). Para la evaluación de la especificidad de destrucción, las células se seleccionaron en poblaciones vivas marcadas con violeta y CFDA-SE. El porcentaje de cada población se informó para el cálculo de supervivencia ajustada como sigue: Supervivencia ajustada = (R1/R2)*100, donde R1 = [(B16F10.9/CD20)/células espectadoras (B16F10.9)]*100 en ausencia de anticuerpo, y R2 = la misma proporción pero en presencia de anticuerpo de ensayo.
55

Tabla 21. Valores de CE₅₀ para destrucción específica de diana en linfocitos B16F10.9/CD20

| Anticuerpo | % de supervivencia de células B16F10.9/CD20 [M] |
|----------------------|---|
| Ab 5 de Control | NA |
| CD3xCD20-wtFc (Ab 4) | 1,282E-11 |
| Anticuerpo 1 | 1,952E-11 |
| NA = Sin actividad. | |

Tanto CD3xCD20-Fc quimérico (Anticuerpo 1) como CD3xCD20-wtFc (Anticuerpo 4) se dirigieron específicamente a linfocitos T humanos para destruir solo células diana que expresan CD20 (Figura 20A-B) en una población mixta de células. La destrucción de células diana solo se observó en presencia del anticuerpo biespecífico, con linfocitos B16F10.9/CD20 empobrecidos de forma dependiente de la dosis por el Anticuerpo 1 (CE₅₀ 19,5 pM) y Anticuerpo 4 (CE₅₀ 12,8 pM) (Figura 20B). Menos del 5 % de células que expresan CD20 estaban vivas a la dosis más alta probada (10 µg/ml) (Figura 20B). No se observó evidencia de destrucción celular en la población de linfocitos B16F10.9 parentales o en la población B16F10.9/CD20 con Ab 5 de Control, un anticuerpo de control de IgG1.

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

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

La capacidad del anticuerpo biespecífico CD3xCD20 para regular positivamente el marcador de activación temprana CD69 en linfocitos T humanos o de cinomolgo en sangre completa se determinó en un ensayo FACS *in vitro* de 20 horas. En resumen, La activación de linfocitos T se evaluó incubando sangre completa humana o de cinomolgo recién aislada (100 µl) en placas de 96 pocillos de fondo plano con diluciones en serie de 5 veces (humano) o 10 veces (cinomolgo) del Anticuerpo 1, Anticuerpo 4 o Ab 5 de Control (rango de concentraciones de 50 nM a 0,0006 nM) en RPMI+L-glutamato a un volumen final de 200 µl durante 20 horas a 37 °C. Después de incubación, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm y el plasma se eliminó. Para medir la regulación positiva de CD69 en linfocitos T, un cóctel de fenotipado que contiene anticuerpos conjugados directamente a CD2 y CD69, así como CD45, CD4, CD8 y CD19 (humano) o CD16 (cinomolgo) se añadió directamente a la sangre durante 30 minutos a 4 °C. Los glóbulos rojos se lisaron durante 15 minutos con 1,5 ml de tampón PharmLyse siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 200 µl de PBS frío + FBS al 1 %, y se analizaron por citometría de flujo utilizando un citómetro BD FACSCanto. Los linfocitos T CD4+ se identificaron por primera vez en linfocitos CD45+ pequeños viables y después en linfocitos T CD19-/CD2+/CD4+ (humanos) o linfocitos T CD16-/CD2+/CD4+ (cinomolgo).

El porcentaje de linfocitos T activados (CD69+) del total de células efectoras CD2+ se informa. Ver Tabla 22 y también Figura 21. Los resultados muestran que los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 activaron significativamente los linfocitos T detectados por el marcador de activación temprana CD69.

Tabla 22. Valores de CE₅₀ para destrucción específica de diana en linfocitos B16F10.9/CD20

| Anticuerpo | % de linfocitos T activados (CD69+) [M] |
|--------------------------------------|---|
| Ab 5 de Control | NA |
| CD3xCD20-wtFc (Ab 4) | 7,907E-11 |
| CD3xCD20-Fc quimérico (Anticuerpo 1) | 1,560E-11 |
| NA = Sin actividad. | |

Ejemplo 16. Los anticuerpos biespecíficos CD3xCD20 inducen la agrupación de linfocitos T con células diana

Un formato de agrupamiento celular se usó para determinar que el anticuerpo biespecífico CD3xCD20 unía linfocitos T con células diana (células CD20+) mediante sus grupos de unión biespecíficos. Las células efectoras se sometieron a tinción previa con CFSE, y las células CD20+ se sometieron a tinción previa con Rastreador de Células Violetas durante 24 horas, y se seleccionaron para separar los cuadrantes después de incubación con un anticuerpo de control irrelevante (Anticuerpo 5 de Control, anticuerpo de isotipo IgG1 irrelevante). Ver Figura 22A, que representa la ausencia de agrupamiento (doble tinción) en la mezcla celular para tratamiento con anticuerpos irrelevantes. Después de incubación con anticuerpo biespecífico CD3xCD20, aparecen agrupamientos celulares debido a la tinción con CFSE y Violeta (ver Figura 22B, en el cuadrante superior izquierdo en el diagrama de dispersión como se resalta con el cuadrado en negrita).

Ejemplo 17. Expresión de marcadores Tim-3 y PD-1 inhibitorios en células CD3+

La disfunción de linfocitos T, o empobrecimiento, ocurre en hospedadores portadores de tumores. Los receptores Tim-3 y PD-1 se han identificado como marcadores de linfocitos T empobrecidos en estados de enfermedad crónica. Según los investigadores Sakuishi, K. et al. (J. Exp. Med. 207(10):2187-2194, 2010), los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que son positivos para Tim-3 y PD-1 (Tim-3+PD-1+TIL) exhiben el fenotipo de empobrecimiento más grave según lo definido por incapacidad para proliferar y producir IL-2, TNF e IFN- γ .

Se extrajeron células positivas para CD3 de sangre y tumores de ratones NSG que se coimplantaron por vía subcutánea con células tumorales Raji emparejadas con HLA y PBMC humanas - ver Ejemplo 12B, anteriormente en este documento. En resumen, se permitió que los tumores se establecieran en el hospedador durante 15 días antes del tratamiento, después los ratones se separaron en dos grupos de tratamiento en función del tamaño del tumor (ver Ejemplo 12B). Se extrajo sangre de los ratones tratados (Ab biespecífico) y no tratados el Día 9 de cada grupo de estudio, es decir, Grupo 1, -200-400 mm³ o Grupo 2, -500-900 mm³. Los ratones que no fueron tratados (vehículo o Ab de Control) con tumores que alcanzan 1500 mm³ se sacrificaron al final del estudio y se evaluó la expresión de PD1 y Tim-3 en estos tumores.

Para experimentos con linfocitos T circulantes, se seleccionaron fracciones de linfocitos T CD45+CD3+ viables para identificación del marcador usando anticuerpos marcados directamente contra Tim-3 o PD-1 (disponibles comercialmente en Biologend). Los linfocitos Tim-3+PD-1+ fueron la fracción predominante de linfocitos T circulantes en sangre de animales no tratados. Sin embargo, los linfocitos T en sangre de animales tratados con anticuerpo biespecífico CD20xCD3 (Ab 1) mostraron fracciones más bajas de linfocitos Tim-3+PD-1+.

Las células tumorales de los hospedadores no tratados se separaron y se tiñeron para viabilidad. El análisis FACS se realizó para células individuales viables para clasificar las fracciones celulares CD45+CD3+, que después se probaron para expresión de Tim-3 o PD-1.

Se encontró que los receptores inhibitorios Tim-3 y PD-1 se expresaban en CD3+TIL en linfomas de linfocitos B de NSG de ratones sin tratar durante los experimentos descritos en Ejemplo 12B, y que los linfocitos Tim-3+PD-1+ fueron la fracción predominante de tumores infiltrantes de linfocitos T.

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

Se evaluó la eficacia de anticuerpos biespecíficos anti-CD3xCD20 seleccionados en la reducción de tumores establecidos en ratones NSG. Los ratones NSG (ratones NOD/LtSz-scid/IL2Ry^{nu/0}; Jackson Laboratories) fueron coimplantados por vía subcutánea con células tumorales Raji (2x10⁶) y PBMC humanas (5x10⁵) (el Día -14) (como en el Ejemplo 12B).

El Ab1 biespecífico CD20xCD3 (dosificado a 0,4 mg/kg; 2x/semana i.p.) fue comparable al CD19xCD3 BiTE (dosificado a 0,5 mg/kg; 5x/semana i.v.) (Figura 23) y superior al tratamiento con rituximab (dosificado a 8 mg/kg; 5x/semana i.p.) (Figura 24) para suprimir tumores Raji establecidos

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

Los investigadores determinaron que ciertas subpoblaciones de cánceres melanoma en pacientes, como células tumorales de melanoma CD20+, pueden representar características que inician el tumor y un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (Pinc et al. Mol Ther. 20(5):1056-1062, 2012, epub 21 Feb 2012). El anticuerpo Ab1 biespecífico CD20xCD3 demostró una potente actividad contra otras células tumorales que expresan CD20, ya que retrasó significativamente el crecimiento tumoral de B16F10.9 (B16F10.9/CD20) transducido por hCD20 en ratones inmunocompetentes.

Ejemplo 20. Un ensayo clínico en Fase 1 para estudiar la seguridad y la tolerabilidad de un anticuerpo monoclonal biespecífico anti-CD20xCD3 en pacientes con neoplasias malignas de linfocitos B CD20+ previamente tratadas con terapia con anticuerpos dirigidos contra CD20

Objetivos de estudio y descripción general

El objetivo principal del presente estudio es evaluar la seguridad, tolerabilidad y toxicidades limitantes de la dosis (DLT) de un anticuerpo monoclonal biespecífico anti-CD20xCD3 administrado por vía intravenosa. El anticuerpo monoclonal biespecífico anti-CD20xCD3 utilizado en el presente estudio es el anticuerpo al que se hace referencia en otras partes del presente documento como "Ab1".

Los objetivos secundarios del estudio son: (a) caracterizar el perfil farmacocinético (PK) de Ab1; (b) evaluar la inmunogenicidad de Ab1; (c) estudiar la actividad antitumoral preliminar de Ab1 administrado a pacientes con neoplasias malignas de linfocitos B CD20+ (linfoma no Hodgkin [NHL] y leucemia linfocítica crónica [CLL]) previamente tratadas con terapia con anticuerpos anti-CD20.

Ciertos objetivos exploratorios del estudio evalúan biomarcadores que pueden correlacionarse con mecanismo de acción, toxicidad observada y posible actividad antitumoral que incluyen, pero sin limitación: perfilado de citoquinas, subconjuntos de linfocitos B y linfocitos T de sangre periférica y fenotipos inmunes, y cambios en la expresión génica en sangre periférica.

5

Diseño del Estudio

Un estudio de aumento de dosis, multicéntrico, sin enmascaramiento se inició con el anticuerpo monoclonal anti-CD20xCD3 "Ab1" administrado como una infusión IV. Los pacientes se asignaron a una cohorte de nivel de dosis (DL) que consiste en una dosis de partida inicial, seguida de una dosis más alta para la segunda y posteriores administraciones de dosis. Los pacientes se inscribieron según la indicación (NHL o CLL). En cada DL, hay 2 cohortes (una para cada indicación), con 3 a 6 pacientes por cohorte.

10

Los pacientes que inicialmente muestran un beneficio clínico y que posteriormente recaen o progresan pueden volver a tratarse con Ab1 en el DL más alto que se considera tolerable en el momento de la recaída o la progresión.

15

Los pacientes ya inscritos se sometieron a procedimientos de detección para determinar la elegibilidad dentro de los 28 días anteriores a la administración inicial de Ab1. Los pacientes se inscribieron secuencialmente según la indicación (NHL o CLL) en orden de confirmación de elegibilidad por parte del patrocinador hasta que cada cohorte se llenara según los criterios del protocolo.

20

Hubo cohortes de aumento de dosis independientes para NHL y CLL en cada DL. Cada DL consta de una dosis inicial y una segunda y posterior dosis, que será mayor que la dosis inicial, siempre que se tolere la dosis inicial.

El aumento de dosis sigue un diseño tradicional de aumento de dosis de 3+3. Se planifican de tres a 6 pacientes por cohorte en función de la toxicidad observada.

25

Una vez completada la fase de aumento de dosis, y tras la determinación de una dosis recomendada para estudio adicional, de planean 3 cohortes de expansión en NHL indolente, NHL agresivo y CLL, con 10 pacientes en cada cohorte de expansión.

30

En el primer DL, habrá un periodo de espera de 48 horas entre las administraciones de fármacos del estudio inicial para los primeros 3 pacientes dentro de la misma indicación. Los pacientes posteriores en el primer DL no serán tratados el mismo día, independientemente de la indicación. En cohortes posteriores, siempre que no se observe toxicidad inesperada en cohortes anteriores o dentro de la cohorte, las infusiones iniciales para los primeros 3 pacientes deben administrarse con al menos 24 horas de diferencia.

35

Después de que cada cohorte de pacientes se enrola, trata y completa el periodo de observación de DLT, la apertura de cohortes de DL posteriores para inscripción (o expansión de la cohorte de DL abierta actual) se determinará una vez que el patrocinador y el investigador hayan revisado los datos de seguridad. El periodo de observación de DLT se define como los primeros 28 días de tratamiento, que en este estudio corresponde con el periodo de inducción. Durante la inducción, los pacientes serán tratados con 4 administraciones semanales de Ab1.

40

Para que DLT sea evaluable, un paciente individual debe haber recibido al menos las 2 primeras administraciones de Ab1 (semana 1 día 1 y semana 2 día 1). Adicionalmente, el paciente debe ser monitorizado durante al menos 28 días después de la primera administración y al menos 21 días desde la segunda administración.

45

Duración del estudio

El periodo de tratamiento es de 6 meses. Los pacientes serán tratados inicialmente con hasta 9 dosis de Ab1 - 4 dosis semanales durante un periodo de inducción de 4 semanas, seguido de 5 dosis adicionales administradas mensualmente durante un periodo de mantenimiento de 5 meses. El periodo de seguimiento será de 6 meses.

50

Población de pacientes

Se pueden requerir hasta 84 pacientes en las cohortes de aumento de dosis para ambas indicaciones (NHL y CLL) durante la fase de aumento de dosis (suponiendo que DL1 a DL7 inscriban a 6 pacientes), se pueden inscribir 36 pacientes adicionales si se añaden DL8 a DL10, y hasta 30 pacientes adicionales (20 NHL [10 cada NHL indolente y agresivo] y 10 CLL) pueden ser necesarios en las cohortes de expansión, para un total de 150 pacientes.

55

Los pacientes deben haber documentado neoplasia maligna de linfocitos B CD20+, con enfermedad activa que no responde a la terapia previa, que se han tratado previamente con terapia de anticuerpos dirigida por CD20, para quienes no existen opciones de atención estándar y para quienes el tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 puede ser apropiado.

60

65

Los criterios de inclusión para el estudio son los siguientes: (1) Tener neoplasia maligna de linfocitos B CD20+

documentada, con enfermedad activa que no responde a la terapia previa, para quienes no existen opciones de atención estándar y para quienes el tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 puede ser apropiado; (2) Debe haber recibido tratamiento previo con una terapia de anticuerpos anti-CD20; (3) Todos los pacientes (NHL de linfocitos B y CLL) deben tener al menos una lesión medible bidimensional $\geq 1,5$ cm documentada por tomografía computarizada; (4) Los pacientes con CLL deben tener glóbulos blancos (WBC) $\leq 200 \times 10^9$; (5) Edad ≥ 18 años; (6) estado de rendimiento del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ≤ 1 ; (7) Esperanza de vida de al menos 6 meses; (8) Función adecuada de la médula ósea documentada por: (a) Recuentos plaquetarios $\geq 75 \times 10^9/l$, (b) Nivel de Hb ≥ 9 g/dl, y (c) ANC $\geq 1 \times 10^9/l$; (9) Función orgánica adecuada; (10) Disposición para someterse a un pretratamiento obligatorio de biopsia tumoral, si a criterio del investigador, el paciente tiene una lesión accesible que puede biopsiarse sin riesgo significativo para el paciente; (11) Dispuesto y capaz de cumplir con las visitas a la clínica y los procedimientos relacionados con el estudio; y (12) Proporcionar consentimiento informado firmado.

Los criterios de exclusión para el estudio son los siguientes: (1) Linfoma primario del sistema nervioso central (SNC) o afectación conocida o sospechada del SNC por LNH no primario del SNC; (2) Historia o patología relevante del SNC actual como (a) Epilepsia, convulsión, paresia, afasia, apoplejía, lesiones cerebrales graves, enfermedad cerebelosa, síndrome cerebral orgánico, psicosis, o (b) Evidencia de presencia de lesiones inflamatorias y/o vasculitis en MRI cerebral; (3) quimioterapia estándar anti-linfoma (no biológica) o radioterapia en los 28 días previos a la primera administración del fármaco del estudio; (4) Terapia previa con blinatumomab; (5) trasplante alogénico de células madre; (6) Tratamiento con rituximab, alemtuzumab u otro agente biológico en investigación o comercial en las 12 semanas previas a la primera administración del fármaco del estudio [NOTA: para pacientes con linfoma agresivo para los que se requiere tratamiento inmediato, el periodo de reposo farmacológico puede reducirse a 28 días]; (7) terapia inmunosupresora (que no sea biológica) en los 28 días posteriores a la primera administración del fármaco del estudio; (8) Tratamiento con un agente no biológico en investigación en los 28 días de la primera administración del fármaco del estudio; (9) Historia de reacciones alérgicas atribuidas a compuestos de composición química o biológica similar del fármaco del estudio; (10) Historia de hipersensibilidad a cualquier compuesto en el grupo de antibióticos tetraciclina; (11) Historia de neoplasia maligna diferente a la neoplasia maligna de linfocitos B en los 5 años anteriores al ingreso al estudio, con la excepción del carcinoma de células basales o escamosas resecaado/extirpado de la piel o carcinoma in situ del cuello uterino; (12) Infecciones bacterianas activas conocidas, virales, fúngicas, micobacterianas u otra infección o cualquier episodio importante de infección que requiera hospitalización o tratamiento con anti-infecciosos IV en las 4 semanas de la primera administración; (13) Evidencia de enfermedad simultánea significativa o afección médica que podría interferir con la realización del estudio, o poner al paciente en un riesgo significativo; (14) Tratamiento continuo con corticosteroides sistémicos, con la excepción del uso de corticosteroides para otras indicaciones (no tumorales y no inmunosupresoras) hasta un máximo de 5 mg/día de prednisona o equivalente; (15) Infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o infección crónica con el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC); (16) Hipersensibilidad conocida tanto al alopurinol como a la rasburicasa; (17) Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia; (18) Hombres o mujeres sexualmente activos en edad fértil que no están dispuestos a practicar la anticoncepción adecuada durante el estudio.

Tratamientos

Ab1 se suministró como un líquido en viales estériles, de un solo uso. Cada vial contiene un volumen extraíble de 1 ml de Ab1 a una concentración de 2 mg/ml. Se proporcionarán instrucciones detalladas de preparación y administración a los sitios en el manual de farmacia.

La dosis inicial de Ab1 a nivel de dosis (DL) 1 fue de 30 mcg; las dosis pueden subir hasta 8000 mcg si se alcanza DL10. Se administraron dosis de Ab1 a pacientes inscritos en un entorno ambulatorio mediante infusión IV durante al menos 60 minutos. Los niveles de dosis se ilustran en Tabla 23.

Tabla 23. Aumento de dosis y cohortes para pacientes con NHL y CLL

| Nivel de dosis | Dosis inicial (mcg) | 2ª y Dosis posterior (mcg) | Indicación: NHL | NHL: (n) | Indicación: LLC | CLL: (n) |
|----------------|---------------------|----------------------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| DL-1 | 10 | 30 | Cohorte 1N* | 3-6 | Cohorte 1C* | 3-6 |
| DL1 | 30 | 100 | Cohorte 1N | 3-6 | Cohorte 1C | 3-6 |
| DL2 | 100 | 300 | Cohorte 2N | 3-6 | Cohorte 2C | 3-6 |
| DL3 | 300 | 1000 | Cohorte 3N | 3-6 | Cohorte 3C | 3-6 |
| DL4 | 1000 | 2000 | Cohorte 4N | 3-6 | Cohorte 4C | 3-6 |
| DL5 | 2000 | 3000 | Cohorte 5N | 3-6 | Cohorte 5C | 3-6 |
| DL6 | 3000 | 4000 | Cohorte 6N | 3-6 | Cohorte 6C | 3-6 |
| DL7 | 4000 | 5000 | Cohorte 7N | 3-6 | Cohorte 7C | 3-6 |
| DL8** | 5000 | 6000 | Cohorte 8N | 3-6 | Cohorte 8C | 3-6 |

50

(continuación)

| Nivel de dosis | Dosis inicial (mcg) | 2ª y Dosis posterior (mcg) | Indicación: NHL | NHL: (n) | Indicación: LLC | CLL: (n) |
|----------------|---------------------|----------------------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| DL9** | 6000 | 7000 | Cohorte 9N | 3-6 | Cohorte 9C | 3-6 |
| DL10** | 7000 | 8000 | Cohorte 10N | 3-6 | Cohorte 10C | 3-6 |

*N=NHL; C=CLL; DL=Nivel de Dosis
 ** Los niveles de dosis 8-10 pueden abrirse si al finalizar DL7, el MTD no se ha determinado, y los parámetros PK, PD y clínicos indican que la dosis biológica óptima puede ser más alta de lo previsto inicialmente.

Los pacientes recibieron Ab1 semanalmente durante un periodo de inducción de 4 semanas, seguido de dosis mensuales por 5 dosis adicionales, a una dosis por su cohorte asignada.

5

Criterios de valoración

El objetivo primario es la seguridad (específicamente, los sucesos adversos [AE] y DLT) para determinar la dosis máxima tolerada (MTD) y/o la dosis biológica óptima (OBD) como la dosis recomendada en fase 2 (RP2D) de Ab1.

10

Los puntos finales secundarios son: (a) Farmacocinética: Concentración de Ab1; (b) Inmunogenicidad: Anticuerpos anti-Ab1; (c) Actividad antitumoral, incluyendo tasa de respuesta general (ORR), Supervivencia sin progresión (PFS) y supervivencia general (OS), y enfermedad residual mínima (MRD) para pacientes con CLL. Con respecto a ORR, la evaluación de la respuesta tumoral se realizará según los Criterios de respuesta revisados para el linfoma maligno del NCI-International Working Group (NCI-WG), y según el Taller internacional sobre pautas de leucemia linfocítica crónica para el diagnóstico y el tratamiento de la CLL.

15

Los puntos finales exploratorios del presente estudio incluyen medidas farmacodinámicas (PD) que incluyen: (a) Subconjuntos y fenotipo de linfocitos B y linfocitos T, (b) niveles de citoquinas circulantes, y (c) proteína C reactiva (PCR).

20

Procedimientos y Evaluaciones

Los procedimientos de referencia incluyen: MRI cerebral, electrocardiograma (ECG), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ensayo de virus de hepatitis C (VHC) y virus de hepatitis B (VHB), y coagulación.

25

Los procedimientos de seguridad incluyen: Historial médico, el examen físico, evaluación de síntomas B, evaluación de estado de rendimiento, ensayos en laboratorio clínico, constantes vitales, AE y medicamentos simultáneos.

30

Los procedimientos de eficacia incluyen: Evaluaciones tumorales, incluyendo tomografías computarizadas, exploraciones de tomografía por emisión de positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa-positrón (FDG-PET), aspirado de médula ósea y biopsias, biopsias de ganglios linfáticos y/o tumorales, y muestras de sangre periférica (solo pacientes con CLL).

35

Se recogieron muestras de sangre para la evaluación PK y anticuerpos anti-fármacos (ADA) para los pacientes inscritos.

Se recogieron muestras de biomarcadores para pacientes inscritos para controlar los cambios en la producción de citoquinas, niveles séricos de citoquinas proinflamatorias y cambios en los subconjuntos de linfocitos y el estado de activación. Además, estas muestras permiten análisis genéticos tumorales o somáticos para detectar variaciones que afectan al transcurso clínico de la enfermedad subyacente o modulan los efectos secundarios del tratamiento.

40

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> MÉTODOS PARA TRATAMIENTO TUMORAL

<130> 10162WO01

50

<140> presentado con la presente

<141> 17-11-2015

<140> 62/160.788

55

<141> 13-05-2015

<140> 62/080.716

<141> 17-11-2014

<160> 75

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 382

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 1

```

gaagtacagc tggtaggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc      60
tcctgtgtag cctctggatt cacctttaat gattatgcca tgcactgggt cgggcaagct      120
ccaggggaagg gcctggaatg ggtctcagtt attagttgga atagtgatag cataggctat      180
goggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat      240
ctgcaaatgc acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat      300
cactatgggt cggggagtta ttactactac caatacggta tggacgtctg gggccaaggg      360
accacgggtca ccgtctcctc ag                                             382
    
```

<210> 2

20 <211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintético

<400> 2

```

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

```

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

30

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

5 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 3
 ggattcacct ttaatgatta tgcc 24

15 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 4

25 Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 5
 attagttgga atagtgatag cata 24

40 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 809 455 T3

<220>
<223> Sintético

5 <400> 10

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

10 <210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 11
ggattcacct ttgatgatta tacc 24

20 <210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintético

<400> 12

30 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Thr
 1 5

<210> 13
<211> 24

ES 2 809 455 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 13
 attagtgga atagtgtag tata 24

10 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintético

<400> 14

20 **Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile**
 1 5

<210> 15
 <211> 48
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

30 <400> 15
 gcaaaagata atagtggcta cggtcactac tactacggaa tggacgtc 48

<210> 16
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

40 <400> 16

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

45 <210> 17
 <211> 320
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintético

<400> 17

ES 2 809 455 T3

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcaaaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcac tatattaact ggctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa 320

5 <210> 18
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

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

15 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 19
 cagagtgtta gcagcaac 18

25 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT

ES 2 809 455 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5
 <400> 20

 Gln Ser Val Ser Ser Asn
 1 5

 10 <210> 21
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Sintético

 <400> 21
 ggtgcatcc 9
 20
 <210> 22
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 22
 30

 Gly Ala Ser
 1

 <210> 23
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético
 40
 <400> 23
 cagcactata ttaactggcc tctcact 27

 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sintético
 50
 <400> 24

 Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5
 55
 <210> 25
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Sintético

ES 2 809 455 T3

<400> 25

```

gccagcacia aaggtcctag cgTTTTTcca cttgccccat gttcaaggtc aacctccgaa      60
agtaccgccc ctcttggtg tctcgtaaaa gattatTTTc ccgaacctgt aactgtctcc      120
tggaactccg gcgcactcac ttccggcgta cataccttcc ccgctgtcct ccaatcttcc      180
ggtctctact ccctgtcttc tgttgctact gttccatcat cctcactcgg cacaaaaaca      240
tatacctgca acgttgatca caagccaagt aataccaaag ttgataagcg cgtcgaatcc      300
aaatacggtc cccccgccc accgtgcccga gcaccacctg tggcaggacc atcagtcttc      360
ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc      480
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg      660
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagtccctc      960
tcctgtctc tgggtaaag a a                                                    981

```

5

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

10

<220>
 <223> Sintético

15

<400> 26

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 27

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

5

10

15

ES 2 809 455 T3

<210> 28
 <211> 326
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 29
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 29

gcctccacca agggcccatac ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aatcttctg acaaaaactca cacatgcca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggacca 360
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag 420
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac 480
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 540
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgtc ctgcaccag actggctgaa cggcaaggag 600

ES 2 809 455 T3

tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 660
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 780
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 840
 gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 960
 aagtcctct cctgtctcc gggtaaatga 990

<210> 30

<211> 329

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 31

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

ES 2 809 455 T3

| | |
|---|-----|
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 300 |
| aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggacca | 360 |
| tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag | 420 |
| gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac | 480 |
| gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc | 540 |
| acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag | 600 |
| tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa | 660 |
| gccaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg | 720 |
| accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc | 780 |
| gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg | 840 |
| gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag | 900 |
| caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacag attcacgag | 960 |
| aagtcctctt ccctgtctcc gggtaaatga | 990 |

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

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 32

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

- <210> 33
- <211> 981
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético

5

ES 2 809 455 T3

<400> 33

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-----|
| gccagcacia | aaggtcctag | cgtttttcca | cttgcccat | gttcaaggtc | aacctccgaa | 60 |
| agtaccgccg | ctcttggtg | tctcgtaaaa | gattattttc | ccgaacctgt | aactgtctcc | 120 |
| tggaactccg | gcgcactcac | ttccggcgta | cataccttcc | ccgctgtcct | ccaatcttcc | 180 |
| ggtctctact | ccctgtcttc | tgttgctcact | gttccatcat | cctcactcgg | cacaaaaaca | 240 |
| tatacctgca | acgttgatca | caagccaagt | aataccaaag | ttgataagcg | cgtcgaatcc | 300 |
| aaatacggtc | ccccctgccc | cccatgtccc | gctccacctg | tggctgggtcc | ctctgttttc | 360 |
| ctttttcccc | ctaaacccaa | agataccctc | atgatttcca | gaacccccga | ggtcacctgc | 420 |
| gtcgtcgttg | atgtaagcca | agaagatccc | gaagtccagt | tcaattggta | tgtagacggg | 480 |
| gttgaagtcc | ataatgcaaa | aacaaaacc | agagaggaac | agtttaattc | aacctatcgt | 540 |
| gtcgttagcg | tactcaccgt | tcttcatcaa | gactgggtca | atggaaaaga | atataaatgt | 600 |
| aaagttagca | acaaaggtct | gccagttca | atcgaaaaaa | caattagcaa | agccaaaggc | 660 |
| caacctcggg | aacccaagt | ctataccttg | cccccttctc | aggaagaaat | gaccaaaaac | 720 |
| caagtttcac | tcacatgcct | cgtaaaagga | ttctatccat | cagacattgc | agtagaatgg | 780 |
| gaatctaacg | gccaacctga | aaataattac | aaaaccactc | ctcctgtcct | cgattctgac | 840 |
| ggctcttttt | tcctttactc | cagattgact | gttgataaat | cccgtggca | ggaaggtaac | 900 |
| gttttttctt | gttctgtgat | gcacgaagcc | ctccataaca | gattcactca | aaaatctctt | 960 |
| tctctctccc | tgggcaaata | a | | | | 981 |

5

<210> 34

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintético

15

<400> 34

ES 2 809 455 T3

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcac tatattaact ggcctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 35
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 35

ES 2 809 455 T3

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

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

ES 2 809 455 T3

<220>
<223> Sintético

5 <400> 36

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt cacctttaat gattatgcca tgcaactgggt ccggcaagct 120
ccaggaagc gcctggaatg ggtctcagtt attagttgga atagtgatag cataggctat 180
gaggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatgc acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat 300
cactatggtt cggggagtta ttactactac caatacggta tggacgtctg gggccaaggg 360
accacggc caagctctc agccagcaca aaaggtccta gcgttttcc acttgcccca 420
tggtcaaggt caacctccga aagtaccgcc gctcttggct gtctcgtaaa agattatatt 480
cccgaacctg taactgtctc ctggaactcc ggcgcactca ctccggcgt acatacctc 540
cccgtgtcc tccaatctc cggctctctac tccctgtctt ctgttgtcac tgttccatca 600
tcctcactcg gcacaaaaac atatacctgc aacgttgatc acaagccaag taataccaaa 660
gttgataagc gcgtcgaatc caatacggc cccccctgcc caccgtgcc agcaccacct 720
gtggcaggac catcagtctt cctgttcccc ccaaaaccca aggacactct catgatctcc 780
cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg gacgtgagcc aggaagacc cgaggtccag 840
ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900
cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagc tgtacaccct gccccatcc 1080
caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
cctcccgtgc tggactccga cggctcctc ttctctaca gcaggctcac cgtggacaag 1260
agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
cactacacac agaagtcctt ctccctgtct ctgggtaaat ga 1362

10 <210> 37
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 37

ES 2 809 455 T3

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

ES 2 809 455 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 195 | | | | | | 200 | | | | | | | 205 |
| Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Pro | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | | |
| Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Arg | Leu | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |

ES 2 809 455 T3

Leu Ser Leu Gly Lys
450

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

10 <220>
<223> Sintético

<400> 38

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatacca tgcactgggt ccggcaagct      120
ccaggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag tataggctat      180
gcggaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtccctgtat      240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat      300
agtggctacg gtcactacta ctacggaatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc      360
gtcgcctcag ccagcacaaa aggtcctagc gtttttccac ttgccccatg ttcaaggcca      420
acctccgaaa gtaccgccgc tcttggctgt ctcgtaaaag attattttcc cgaacctgta      480
actgtctcct ggaactccgg cgcactcact tccggcgtac ataccttccc cgctgtcctc      540
caatcttccg gtctctactc cctgtcttct gttgtcactg ttccatcacc ctccactcggc      600
acaaaaacat atacctgcaa cgttgatcac aagccaagta ataccaaagt tgataagcgc      660
gtcgaatcca aatacgggcc cccctgccc cccctgcccag caccacctgt ggcaggacca      720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag      780
gtcacgtgcg tgggtgggga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac      840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatcca ggaggagatg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aggtcaccgc tggacaagag caggtggcag     1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacag attcacacag     1320
aagtcctctt ccctgtctct gggtaaatga                                     1350

```

15 <210> 39
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 809 455 T3

<220>
<223> Sintético

5 <400> 39

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| gaagtgcagc | tggtggagtc | tgggggaggc | ttggtacagc | ctggcaggtc | cctgagactc | 60 |
| tcctgtgcag | cctctggatt | cacctttgat | gattatacca | tgactggggt | ccggcaagct | 120 |
| ccagggaaag | gcctggagtg | ggtctcaggt | attagttgga | atagtggtag | tataggctat | 180 |
| gcggactctg | tgaagggccg | attcaccatc | tccagagaca | acgccaagaa | gtccctgtat | 240 |
| ctgcaaatga | acagtctgag | agctgaggac | acggccttgt | attactgtgc | aaaagataat | 300 |
| agtggctacg | gtcactacta | ctacggaatg | gacgtctggg | gccaaaggac | cacggtcacc | 360 |
| gtcgcctcag | ccagcacaaa | aggtcctagc | gtttttccac | ttgccccatg | ttcaaggtca | 420 |
| acctccgaaa | gtaccgccgc | tcttggctgt | ctcgtaaaag | attattttcc | cgaacctgta | 480 |
| actgtctcct | ggaactccgg | cgcactcact | tccggcgta | ataccttccc | cgctgtcctc | 540 |
| caatcttccg | gtctctactc | cctgtcttct | gttgtcactg | ttccatcatc | ctcactcggc | 600 |
| acaaaaacat | atacctgcaa | cgttgatcac | aagccaagta | ataccaaagt | tgataagcgc | 660 |
| gtcgaatcca | aatacgggtc | cccctgcccc | ccatgtcccg | ctccacctgt | ggctgggtccc | 720 |
| tctgttttcc | tttttcccc | taaacccaaa | gataccctca | tgatttccag | aacccccgag | 780 |
| gtcacctgcg | tcgtcgttga | tgtaagccaa | gaagatcccg | aagtccagtt | caattggtat | 840 |
| gtagacggtg | ttgaagtcca | taatgcaaaa | acaaaaccca | gagaggaaca | gtttaattca | 900 |
| acctatcgtg | tcgttagcgt | actcaccggt | cttcatcaag | actggctcaa | tgghaaaagaa | 960 |
| tataaatgta | aagttagcaa | caaaggtctg | cccagttcaa | tcgaaaaaac | aattagcaaa | 1020 |
| gccaaaggcc | aacctcgcga | acccaagtc | tataccttgc | ccccttctca | ggaagaaatg | 1080 |
| acaaaaaacc | aagtttcact | cacatgcctc | gtaaaaggat | tctatccatc | agacattgca | 1140 |
| gtagaatggg | aatctaacgg | ccaacctgaa | aataattaca | aaaccactcc | tcctgtcctc | 1200 |
| gattctgacg | gctctttttt | cctttactcc | agattgactg | ttgataaatc | ccgctggcag | 1260 |
| gaaggtaacg | ttttttcttg | ttctgtgatg | cacgaagccc | tccataacag | attcactcaa | 1320 |
| aaatctcttt | ctctctccct | gggcaaataa | | | | 1350 |

10 <210> 40
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 40

ES 2 809 455 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

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

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 41

ES 2 809 455 T3

gaagtacagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggatt cacctttaat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

ccagggaaagg gcctggaatg ggtctcagtt attagttgga atagtgatag cataggctat 180

gctggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatgc acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat 300

cactatgggt cggggagtta ttactactac caatacggta tggacgtctg gggccaaggg 360

accacgggtca ccgtctcctc agcctccacc aagggcccat cggctctccc cctggcaccc 420

tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 480

cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc 540

ccggctgtcc tacagtctc aggactctac tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc 600

agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag 660

gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 720

gcaccacctg tggcaggacc atcagttctc ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc 780

atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc 840

gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggagggtgc ataatgcca gacaaagccg 900

cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960

gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 1020

atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080

ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200

aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1260

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1320

ctgcacaacc actacagca gaagtccctc tcctgtctc cgggtaaatg a 1371

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 42

5

10

ES 2 809 455 T3

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 43

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatacca tgcactgggt cgggcaagct 120
 ccaggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag tataggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtcctgtat 240

ES 2 809 455 T3

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagataat 300
 agtggctacg gtcactacta ctacggaatg gacgtctggg gcccaagggac cacggtcacc 360
 gtcgcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660
 gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccacg accacctgtg 720
 gcaggacct cagtcttctt gttccccca aaaccaagg aactctcat gatctcccg 780
 acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc 840
 aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
 ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac 960
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc 1020
 atctccaaag ccaaagggca gccccagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1080
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct 1200
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1260
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaacaga 1320
 ttcacgcaga agtccctctc cctgtctccg ggtaaatga 1359

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

5

10

ES 2 809 455 T3

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

ES 2 809 455 T3

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

ES 2 809 455 T3

305 310 315 320

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

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 47

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

ES 2 809 455 T3

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

- <210> 48
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético
- <400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 49

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

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

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

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

5

10

ES 2 809 455 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

ES 2 809 455 T3

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

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

10 <220>
<223> Sintético
<400> 50

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

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

20 <220>
<223> Sintético
<400> 51

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
1 5

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

30 <220>
<223> Sintético
<400> 52

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
1 5

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

40 <220>
<223> Sintético
<400> 53

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

Pro Pro Val Ala
20

45 <210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>

ES 2 809 455 T3

<223> Sintético

<400> 54

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

5 Ala

<210> 55

<211> 104

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 55

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100

20 <210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sintético

<400> 56

ES 2 809 455 T3

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

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 57
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintético

<400> 57

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

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

15

ES 2 809 455 T3

<210> 58
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 58

```

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

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          20           25           30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          35           40           45

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

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65           70           75           80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          85           90           95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100           105
    
```

<210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintético

20

<400> 59

ES 2 809 455 T3

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

<210> 60
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 60

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

ES 2 809 455 T3

<210> 61
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 61

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

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

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

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

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

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

Arg Val

<210> 62
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintético

20

<400> 62

ES 2 809 455 T3

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

5 <210> 63
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 63
 ttcgcgagc ttaggttat gccagggggg acgggtggca cgggtcgtgg tggacaccgt 60

15 <210> 64
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 64
 aagcttatac tcgagctcta gattgggaac ccgggtctct 40

25 <210> 65
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 65
 cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaa 58

40 <210> 66
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 809 455 T3

| | | |
|----|--|----|
| | <220> | |
| | <223> Sintético | |
| 5 | <400> 66 tgtgtctca gggagagga cagagacca ttactcgcc ggcg | 44 |
| | <210> 67 | |
| | <211> 60 | |
| 10 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sintético | |
| 15 | <400> 67 ctcgggttta gaacactgtt ttgagtgtg acgggtggca cgggtcgtgg tggacaccgt | 60 |
| | <210> 68 | |
| | <211> 51 | |
| 20 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sintético | |
| 25 | <400> 68 aaatcttgg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag caccactgt g | 51 |
| | <210> 69 | |
| 30 | <211> 54 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 35 | <223> Sintético | |
| | <400> 69 gagaaaacca tctcaaagc caaagggcag ccccgagaac cacagtgta cacc | 54 |
| 40 | <210> 70 | |
| | <211> 54 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Sintético | |
| | <400> 70 ctcttttgg agagtttcg gttcccgtc ggggctctg gtgtccacat ggg | 54 |
| 50 | <210> 71 | |
| | <211> 39 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> | |
| | <223> Sintético | |
| | <400> 71 cttcaggag agggacagag gccatttac tcgccggcg | 39 |
| 60 | <210> 72 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 65 | <213> Secuencia artificial | |

ES 2 809 455 T3

<220>
 <223> Sintético

5 <400> 72
 gctgacagac taacagactg 20

10 <210> 73
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintético

20 <400> 73
 atacattata cgaagtata ccggtata 26

25 <210> 74
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 1 5 10 15

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 35 40 45

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 50 55 60

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 65 70 75 80

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 85 90 95

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

30 <210> 75
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético

<400> 75

ES 2 809 455 T3

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico para uso en un método de tratamiento o mejora del cáncer de linfocitos B en un sujeto, que comprende administrar un protocolo de aumento de dosis que reduce el efecto de una cascada de citoquinas, en donde el protocolo de aumento de dosis comprende administrar una primera dosis del anticuerpo durante un primer periodo de tiempo y administrar consecutivamente una segunda dosis de dicho anticuerpo durante un segundo periodo de tiempo, en donde dicha segunda dosis supera dicha primera dosis, en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a CD3 humano, un segundo dominio de unión a antígeno que se une a CD20 humano, y un dominio Fc quimérico unido a cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde el dominio Fc quimérico comprende:
- (a) una secuencia de aminoácidos de la bisagra inferior de IgG2 humana que comprende PCPAPPVA (SEQ ID NO: 52) desde las posiciones 228 a 236 según la numeración EU;
 - (b) una IgG1 humana o una secuencia de aminoácidos de la bisagra superior de IgG4 humana desde las posiciones 216 a 227 según la numeración EU;
 - (c) una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana desde las posiciones 237 a 340 según la numeración EU; y
 - (d) un dominio CH1 de IgG1 humana y un dominio CH3 de IgG1 humana, o un dominio CH1 de IgG4 humana y un dominio CH3 de IgG4 humana;
- en donde el anticuerpo biespecífico exhibe una mayor afinidad de unión por FcγRIIA humano respecto a FcγRIIB humano, y exhibe poca o ninguna afinidad de unión detectable por FcγRI humano y FcγRIII humano, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.
2. Un anticuerpo biespecífico para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento o mejora del cáncer de linfocitos B comprende:
- (i) suprimir el crecimiento tumoral en el sujeto, en donde la supresión del crecimiento tumoral comprende:
 - (a) inhibir el crecimiento de los tumores,
 - (b) disminuir el tamaño de los tumores, o
 - (c) disminuir el número de tumores;
 - (ii) mediar la lisis de linfocitos B en el sujeto, en donde los linfocitos B son linfocitos pre-B, linfocitos B maduros, o células de linfoma no Hodgkin de linfocitos B; o
 - (iii) tratar el cáncer que es positivo para la expresión de CD20 en el sujeto, en donde el sujeto se selecciona sobre la base de un cáncer residual.
3. Un anticuerpo biespecífico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde:
- (i) el cáncer es linfoma o leucemia; y/o
 - (ii) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma linfoblástico de linfocitos B, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, leucemia de células pilosas y linfoma de Burkitt.
4. Un anticuerpo biespecífico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la primera dosis es de hasta 1000 microgramos.
5. Un anticuerpo biespecífico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:
- (i) el sujeto padece un tumor que es resistente, o que responde incompletamente a (a) la terapia mono-específica anti-CD20 sola, o (b) la monoterapia con rituximab; y/o
 - (ii) en donde el sujeto ha recibido una terapia de anticuerpo mono-específico anti-CD20 al menos de 1 día a 1 año antes de la administración del anticuerpo biespecífico.
6. Un anticuerpo biespecífico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo biespecífico comprende:
- (a) una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 53); o
 - (b) una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 54).
7. Un anticuerpo biespecífico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:
- (a) el primer dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende SEQ ID NO: 10;
 - (b) el primer dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena

ligera (LCVR) que comprende SEQ ID NO: 18;

(c) el segundo dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende SEQ ID NO: 2;

5 (d) el primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende SEQ ID NO: 10, y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende SEQ ID NO: 18;

(e) el segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD20 humano comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende SEQ ID NO: 2, y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende SEQ ID NO: 18;

10 (f) el primer dominio de unión a antígeno (A1) comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3), en donde

(i) A1-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12;

15 (ii) A1-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14;

(iii) A1-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16;

(iv) A1-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;

(v) A1-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; y

20 (vi) A1-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24;

(g) el segundo dominio de unión a antígeno (A2) que se une específicamente a CD20 humano comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3), en donde

(i) A2-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4;

(ii) A2-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6;

(iii) A2-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

(iv) A2-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;

30 (v) A2-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; y

(vi) A2-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24; o

(h) el primer dominio de unión a antígeno (A1) que se une específicamente a CD3 humano comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (A1-HCDR1, A1-HCDR2, A1-HCDR3) y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (A1-LCDR1, A1-LCDR2, A1-LCDR3), y en donde el segundo dominio de unión a antígeno (A2) que se une específicamente a CD20 humano comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3) y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (A2-LCDR1, A2-LCDR2 y A2-LCDR3); en donde

(i) A1-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12;

40 (ii) A1-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14;

(iii) A1-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16;

(iv) A1-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;

(v) A1-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22;

(vi) A1-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24;

45 (vii) A2-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4;

(viii) A2-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6;

(ix) A2-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

(x) A2-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;

(xi) A2-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; y

50 (xii) A2-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24.

8. Un anticuerpo biespecífico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:

el primer dominio de unión a antígeno compite por unirse a CD3 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia, que comprende:

55 (a) tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3) y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (A1-LCDR1, A1-LCDR2 y A1-LCDR3), en donde (i) A1-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12; (ii) A1-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14; (iii) A1-HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16; (iv) A1-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20; (v) A1-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; y (vi) A1-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24; o

(b) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18; o

65 el segundo dominio de unión a antígeno compite por unirse a CD20 humano con una proteína de unión a antígeno de

referencia que comprende:

- 5 (c) tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3) y tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (A2-LCDR1, A2-LCDR2 y A2-LCDR3), en donde (i) A2-HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4; (ii) A2-HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6; (iii) A2-HCDR3 comprende SEQ ID NO: 8; (iv) A2-LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20; (v) A2-LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; y (vi) A2-LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24; o
- 10 (d) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18; o

el primer dominio de unión a antígeno compite por unirse a CD3 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia que comprende (i) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10, y (ii) una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18; y el segundo dominio de unión a antígeno compite por unirse a CD20 humano con una proteína de unión a antígeno de referencia que comprende (iii) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18.

15

20 9. Un anticuerpo biespecífico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo:

- (a) se une a células humanas que expresan CD3 humano y células de mono cinomolgo que expresan CD3 de cinomolgo;
- 25 (b) se une a linfocitos T humanos o a linfocitos T de cinomolgo;
- (c) se une a células humanas que expresan CD20 humano;
- (d) se une a linfocitos B humanos;
- (e) se une a linfocitos T humanos que expresan CD3 con un valor de CE_{50} entre 1×10^{-12} M y 1×10^{-6} M;
- (f) se une a linfocitos T humanos que expresan CD3 con un valor de CE_{50} entre 1×10^{-9} M y 1×10^{-8} M;
- 30 (g) se une a linfocitos B humanos que expresan CD20 con un valor de CE_{50} entre 1×10^{-12} M y 1×10^{-6} M;
- (h) se une a linfocitos B humanos que expresan CD20 con un valor de CE_{50} entre 1×10^{-9} M y 1×10^{-8} M; o
- (i) mejora la citotoxicidad mediada por linfocitos T de linfocitos B humanos que son resistentes o refractarios a la citotoxicidad mediada por anti-CD20.

Construcción de bisagra quimérica

| | | Bisagra superior | | | | | | | | | | | | Bisagra inferior | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----|------------------|-----|------------------|------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Numeración de EU para IgG1 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Numeración de Kabat para IgG1 | 226 | 227 | 228 | 232 ^a | 233 ^a | 234 ^a | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG1 | E | P | K | S | C | D | K | T | H | T | C | P | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IgG4 | E | S | K | Y | G | -- | -- | -- | P | P | C | P | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Numeración de EU para IgG4 | 215 | 217 | 218 | 219 ^a | 220 ^b | | | | 224 | 225 | 226 | 227 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Numeración de Kabat para IgG4 | 225 | 227 | 228 | 229 | 230 | | | | 237 | 238 | 239 | 240 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | IgG2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | Numeración de EU para IgG2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | Numeración de Kabat para IgG2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | P | C | A | P | P | C | A | P | P | A | P | P | V | A | | |
| | | | | | | | | | | | | | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 |

-- significa número informado no correspondiente

--- significa aminoácido no correspondiente

^a numeración según el último Diagrama Científico actualizado del IMGT (IMGT*, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics

http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHGnber.html, creado: 17 d mayo de 2001, última actualización 10 de enero de 2013)

^b numeración según el índice EU como se informa en Kabat E.A. et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., US Department of Health and Human Services, Publicación del NIH N.º 91 3242 (1991)

FIG. 1

ES 2 809 455 T3

| | | | | | |
|--|-----|-----|------------------------|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| <u>ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLOSS</u> | | | | | |
| | | | ←C1 Bisagra Superior/→ | | C2→ |
| Inferior | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| <u>GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG</u> | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| <u>PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN</u> | | | | | |
| C3→ | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| <u>STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE</u> | | | | | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| <u>LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW</u> | | | | | |
| 310 | 320 | 330 | | | |
| <u>QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK</u> | | | | | |

Región constante de cadena pesada IGHG1 humana
 N.º P01857 de Acceso en UniProtKB/Swiss-Prot
 (SEQ ID NO:45)

FIG. 2

ES 2 809 455 T3

```

      10          20          30          40          50          60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPVAVLQSS
                                     Bisagra Superior/
                                     <---CH1---> <---CH2--->
                                     Inferior
      70          80          90          100         110         120
GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPKPS NTKVDKTVER KCCVECPCPC APPVAGPSVF
      130         140         150         160         170         180
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR
                                     CH3--->
      190         200         210         220         230         240
VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
      250         260         270         280         290         300
QVSLTCLVKG FYPSDISVEW ESNQOPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
      310         320
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

Región constante de cadena pesada IGHG2 humana
 N.º P01859 de Acceso en UniProtKB/Swiss-Prot
 (SEQ ID NO:46)

FIG. 3

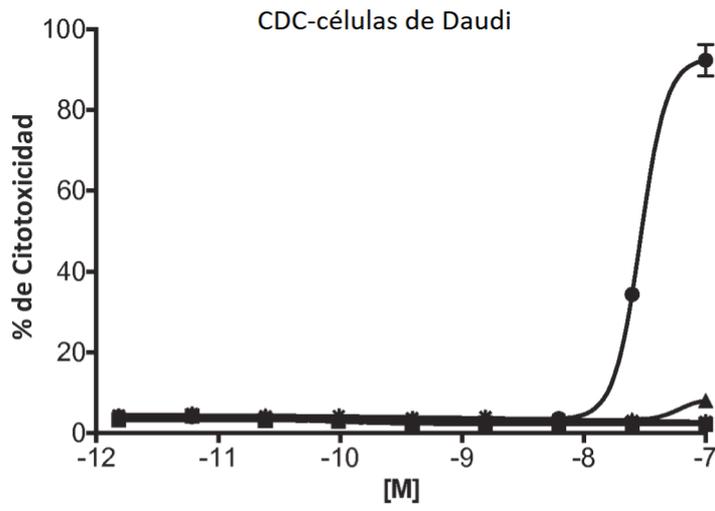


FIG. 5A

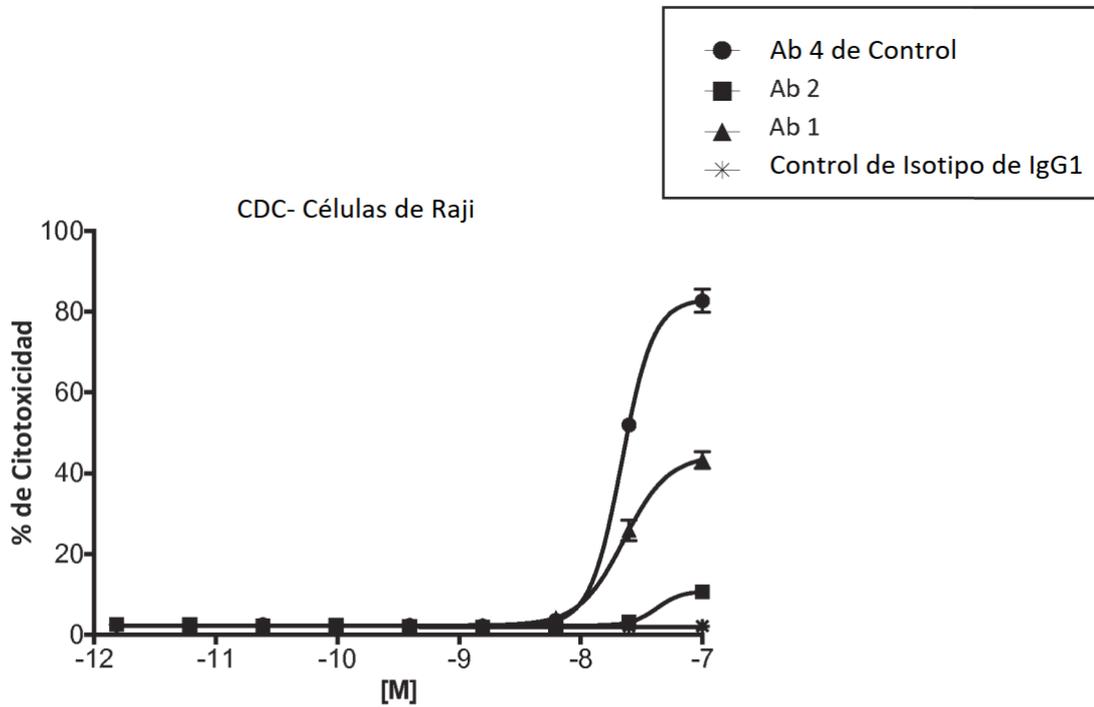


FIG. 5B

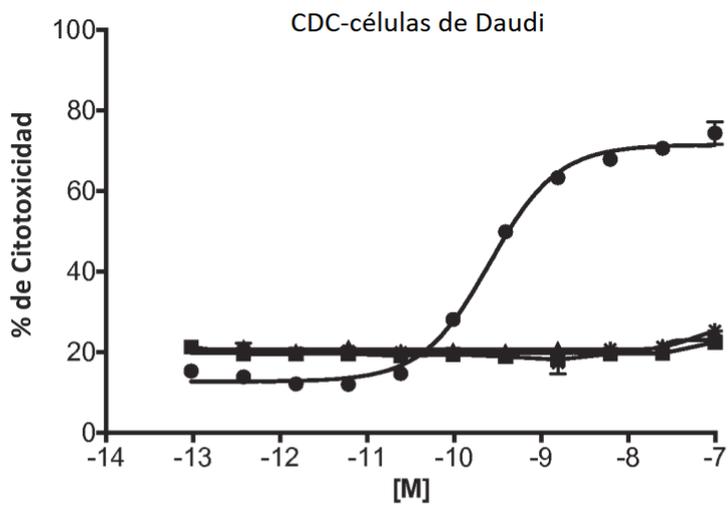


FIG. 6A

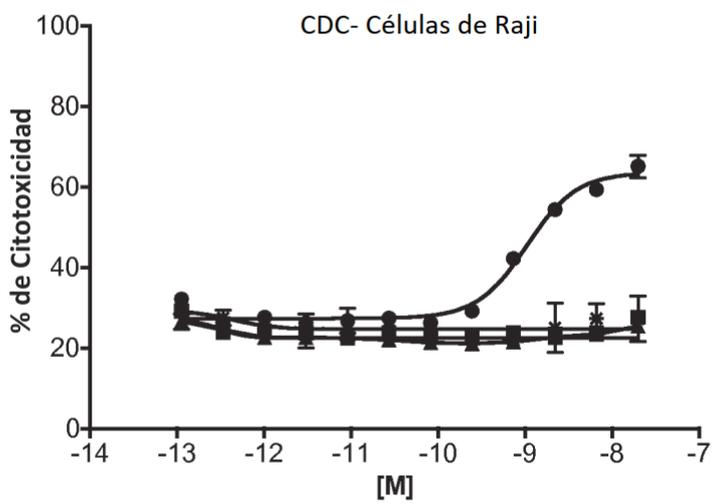
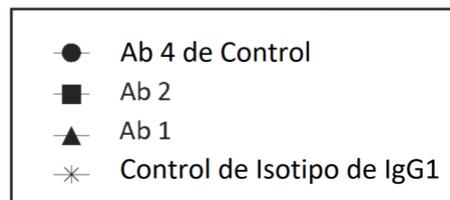


FIG. 6B

Tratamiento con Ab1 o Control de ratones NSG implantados con células tumorales Raji y PBMCs

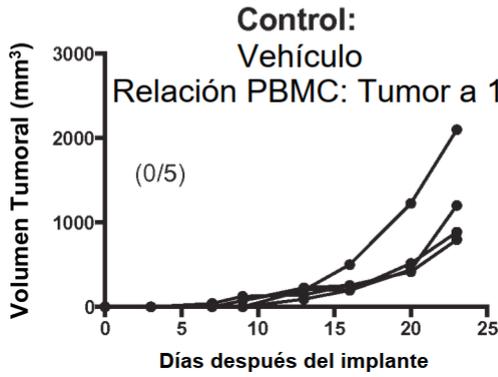


FIG. 7A

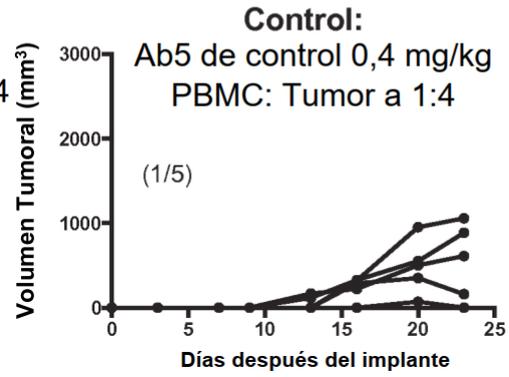


FIG. 7B

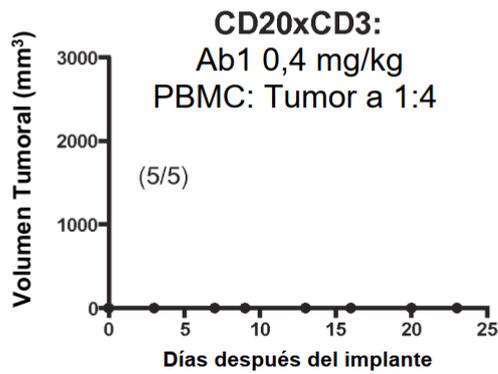


FIG. 7C

Tratamiento con Ab1 o Control de ratones NSG implantados con células tumorales Raji y PBMCs

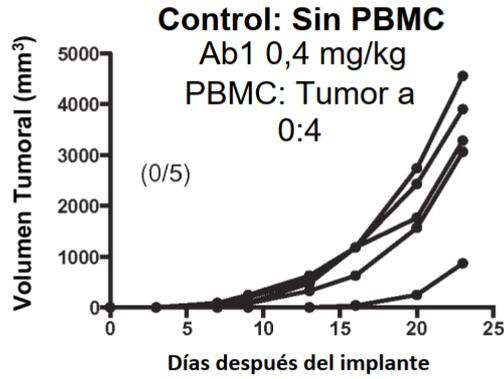


FIG. 7D

Tratamiento con Ab1 o Control de ratones NSG implantados con células tumorales Raji y PBMCs

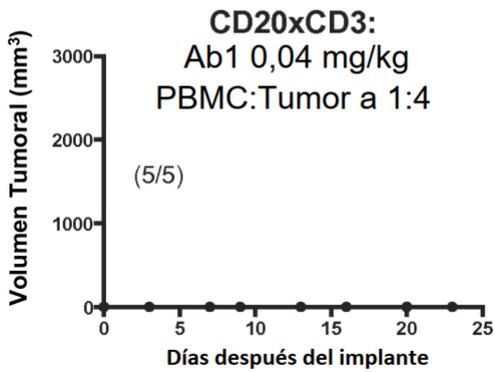


FIG. 7E

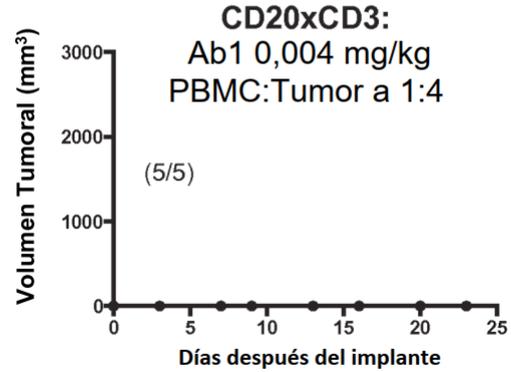


FIG. 7F

Ratones NSG con mlgG2a Fc suplementado

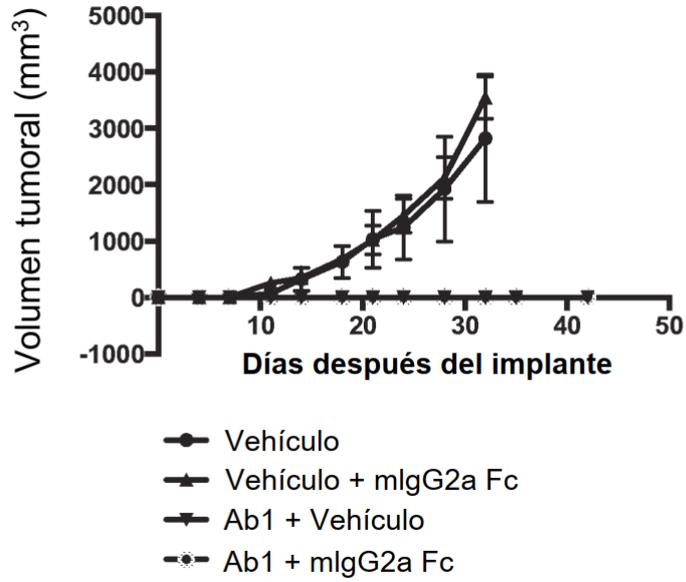


FIG. 8A

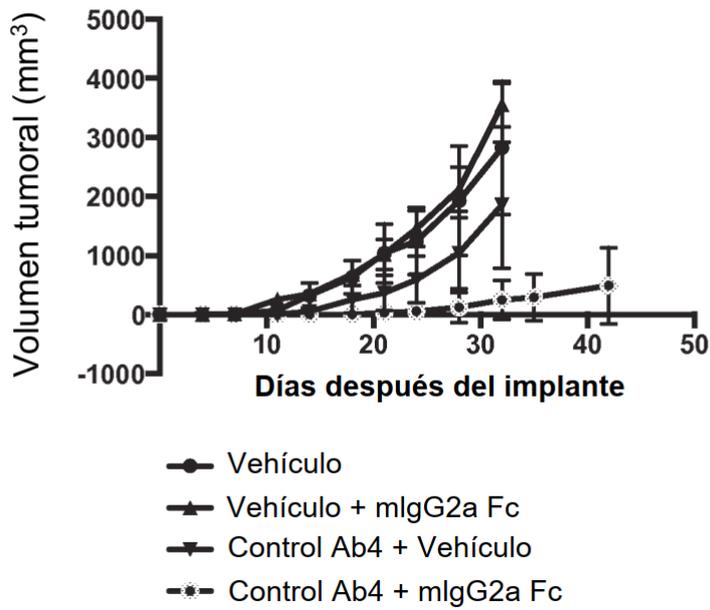


FIG. 8B

Tratamiento de Tumores de ~200-400 mm³ Establecidos en Ratones NSG con Anticuerpo Biespecífico CD3xCD20

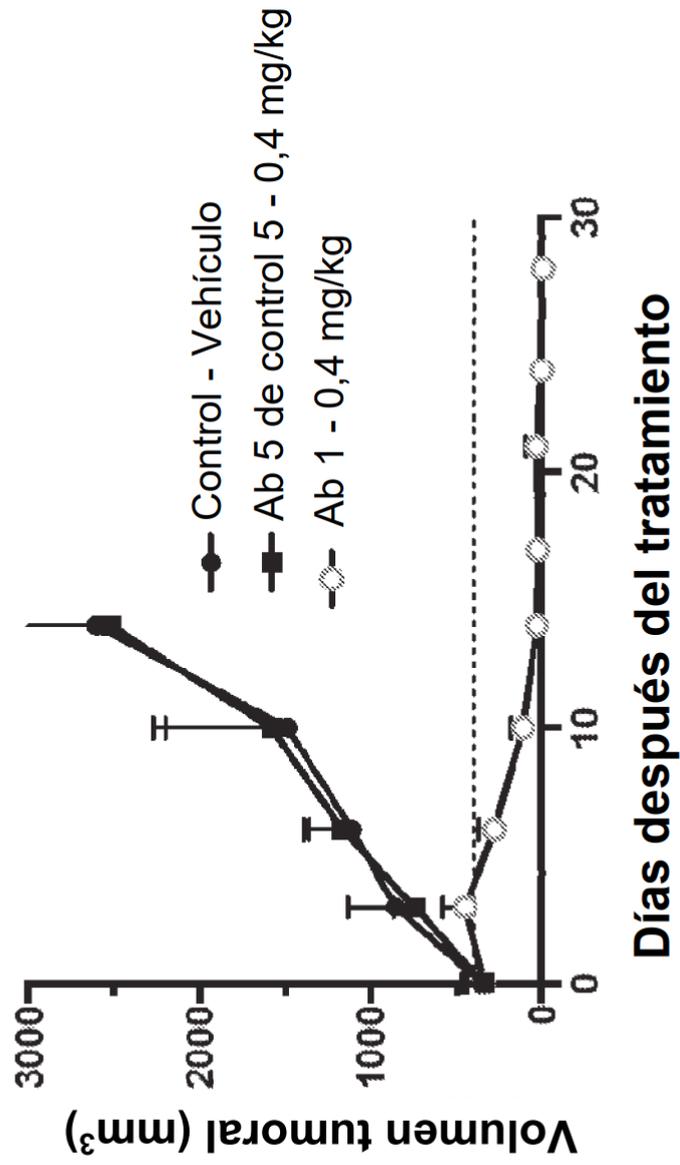


Fig. 9

Tratamiento de Tumores de ~500-900 mm³ Establecidos en Ratones NSG con Anticuerpo Biespecifico CD3xCD20

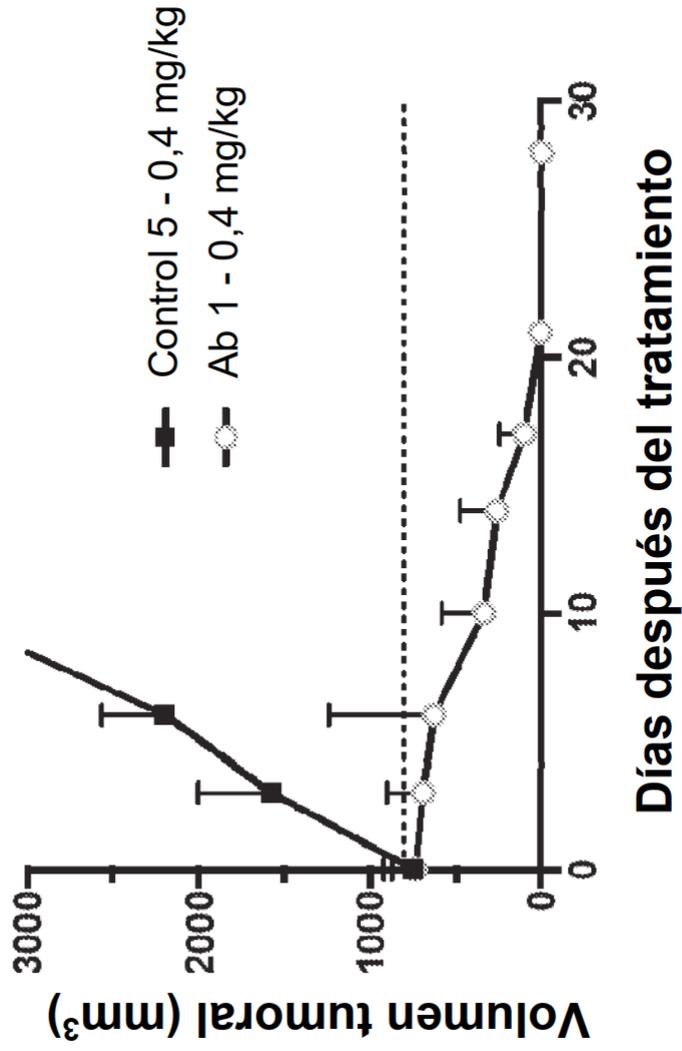
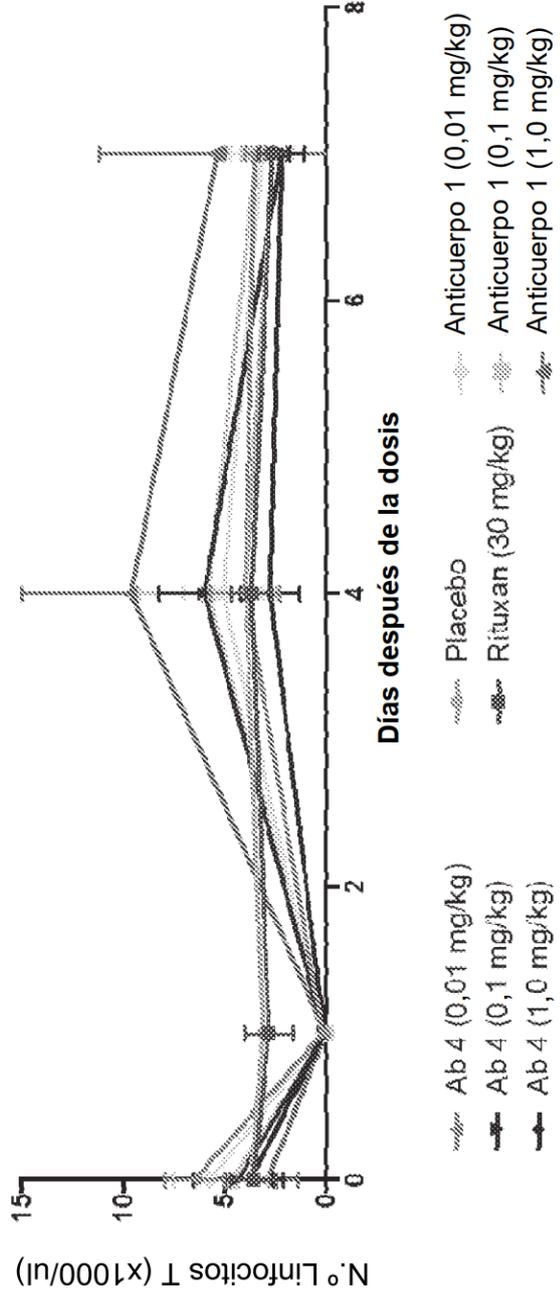
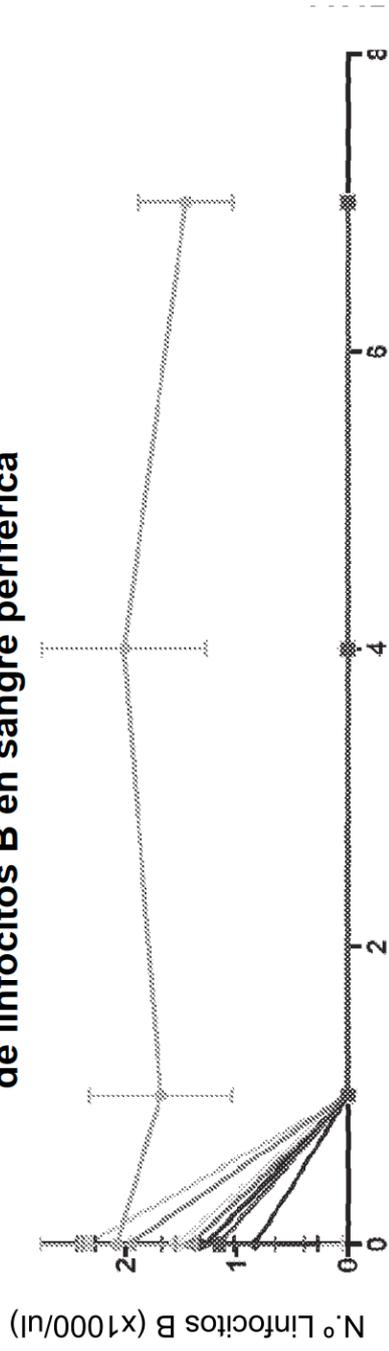


Fig. 10

Los Anticuerpos CD20 Monoespecífico y CD3xCD20 Biespecífico muestran empobrecimiento de linfocitos B en sangre periférica



- Ab 4 (0,01 mg/kg)
- Ab 4 (0,1 mg/kg)
- Ab 4 (1,0 mg/kg)
- Placebo
- Rituxan (30 mg/kg)
- Anticuerpo 1 (0,01 mg/kg)
- Anticuerpo 1 (0,1 mg/kg)
- Anticuerpo 1 (1,0 mg/kg)

CD3xCD20 Biespecificos median el empobrecimiento de linfocitos B circulantes en monos

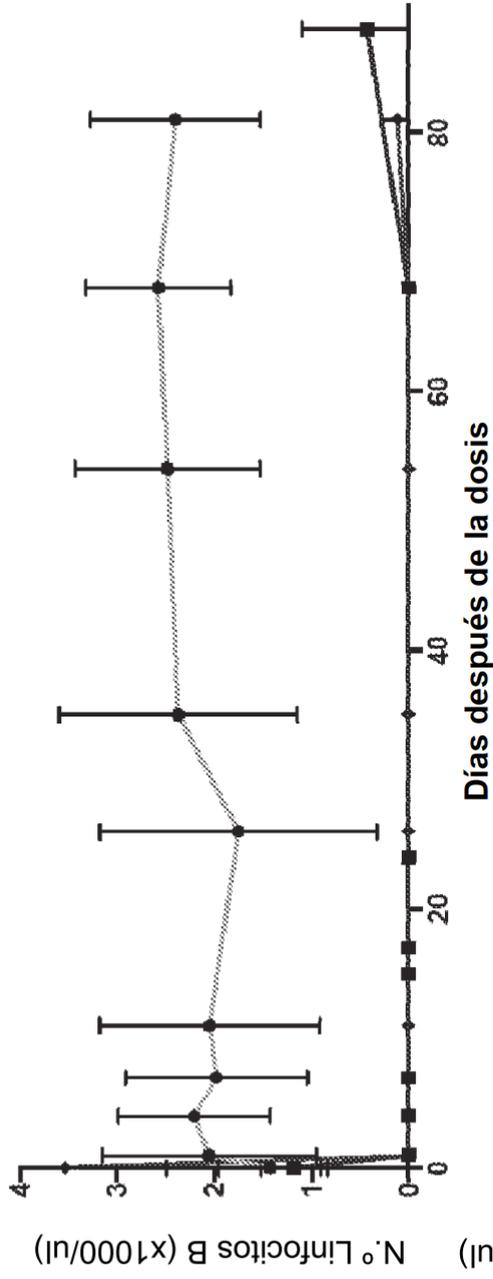


Fig. 12A

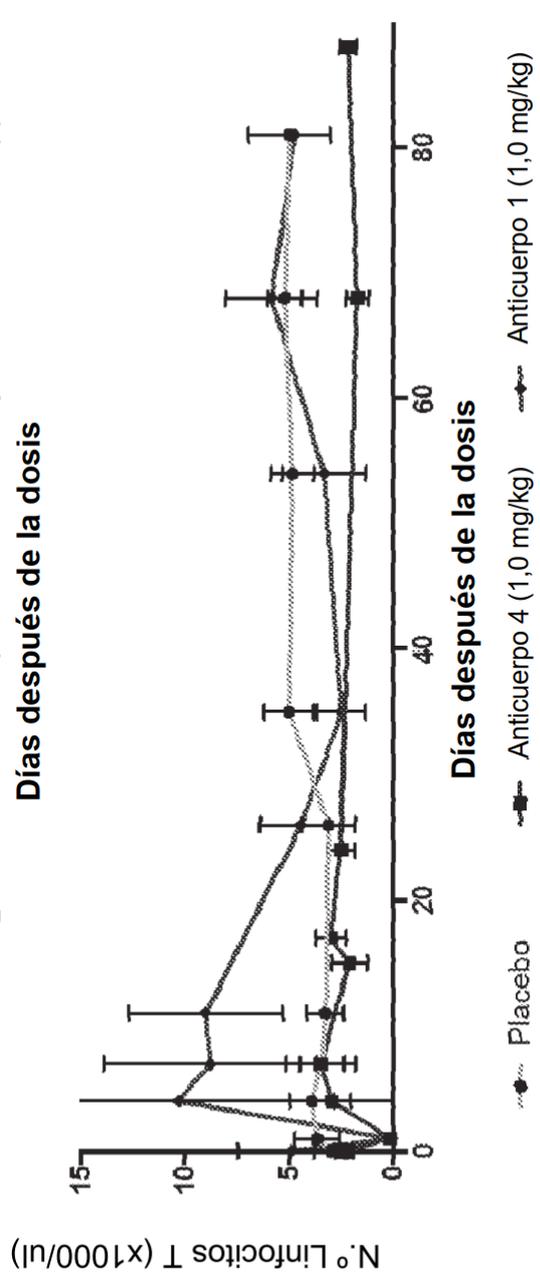


Fig. 12B

● Placebo ■ Anticuerpo 4 (1,0 mg/kg) ◆ Anticuerpo 1 (1,0 mg/kg)

Los Anticuerpos CD3xCD20 Biespecificos muestran empobrecimiento de linfocitos B en sangre periférica a niveles de dosis baja

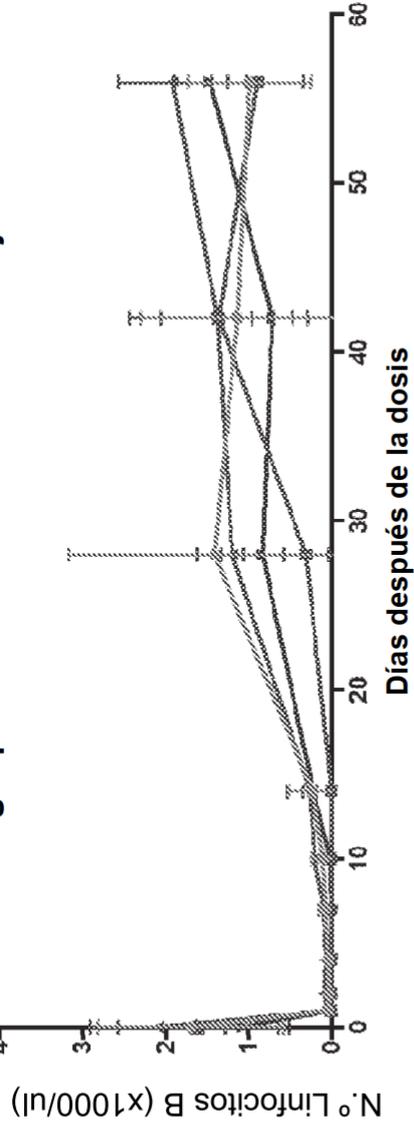


Fig. 13A

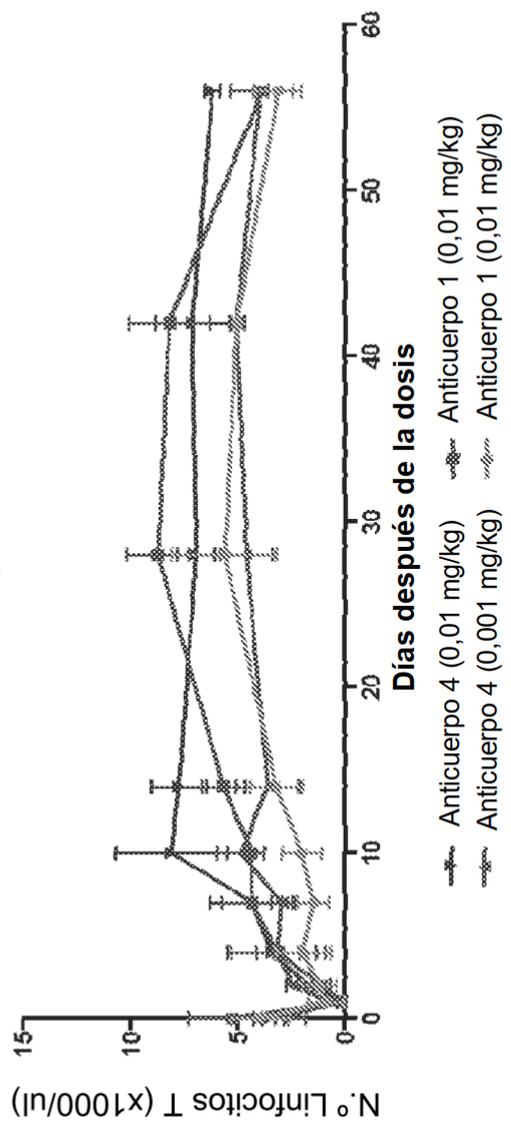


Fig. 13B

Anticuerpo 4 (0,01 mg/kg) Anticuerpo 1 (0,01 mg/kg)
 Anticuerpo 4 (0,001 mg/kg) Anticuerpo 1 (0,001 mg/kg)

**La recuperación de linfocitos B se correlaciona con la pérdida de niveles de Ab
biespecífico circulante detectable**

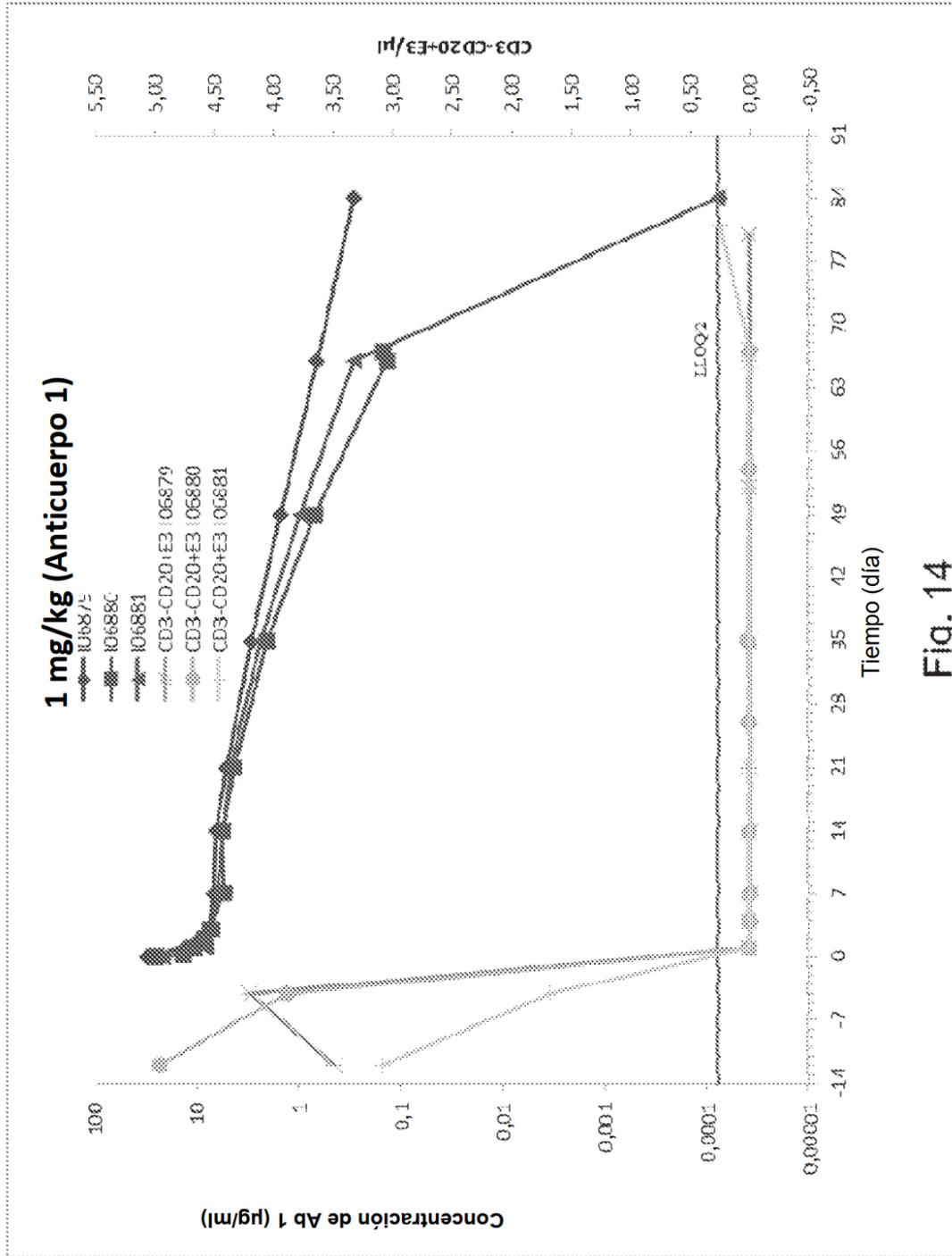


Fig. 14

La recuperación de linfocitos B se correlaciona con la pérdida de niveles de Ab
biespecífico circulante detectable

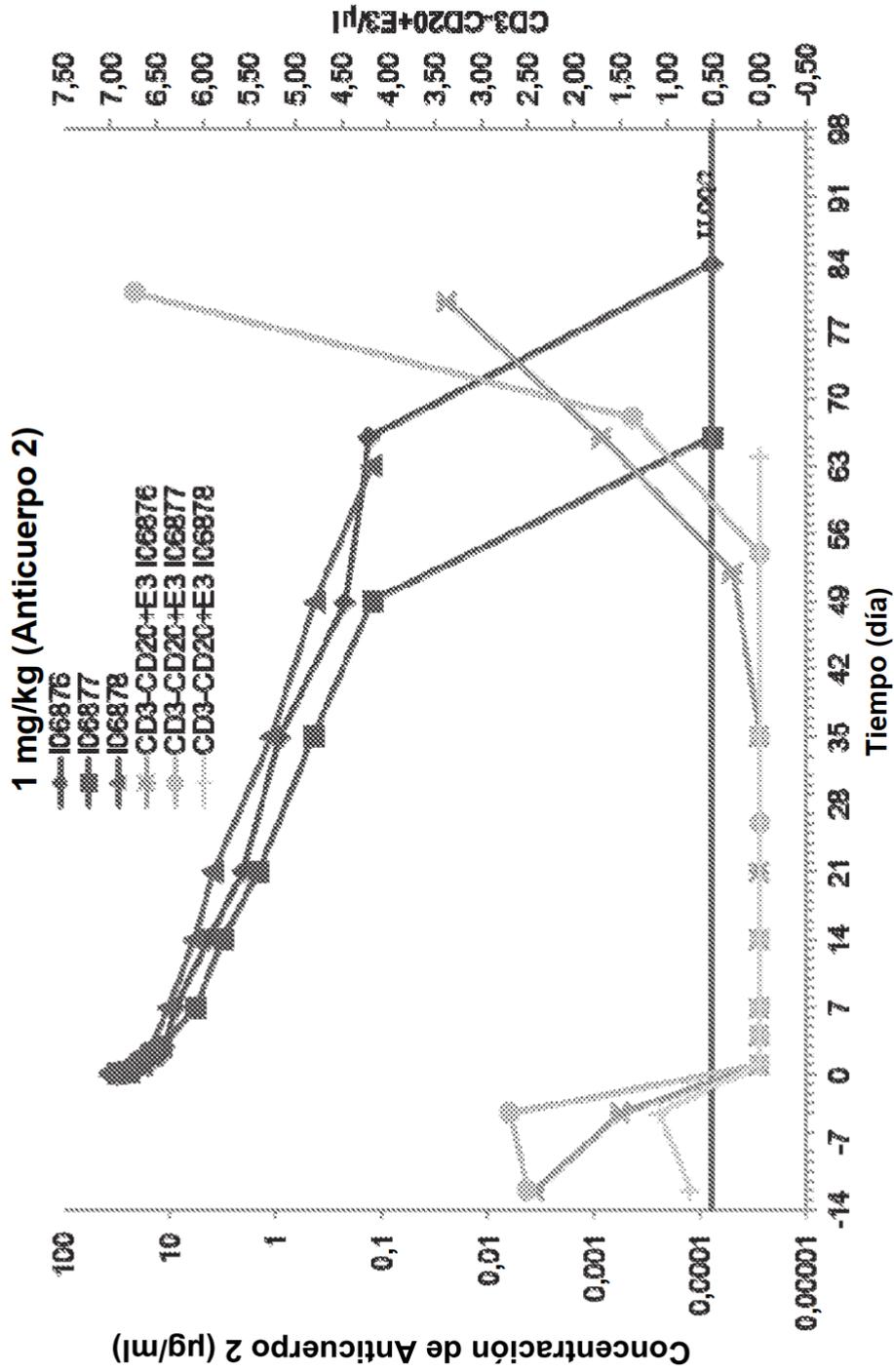


Fig. 15

**La recuperación de linfocitos B se correlaciona con la pérdida de niveles de Ab biespecífico
circulante detectable**

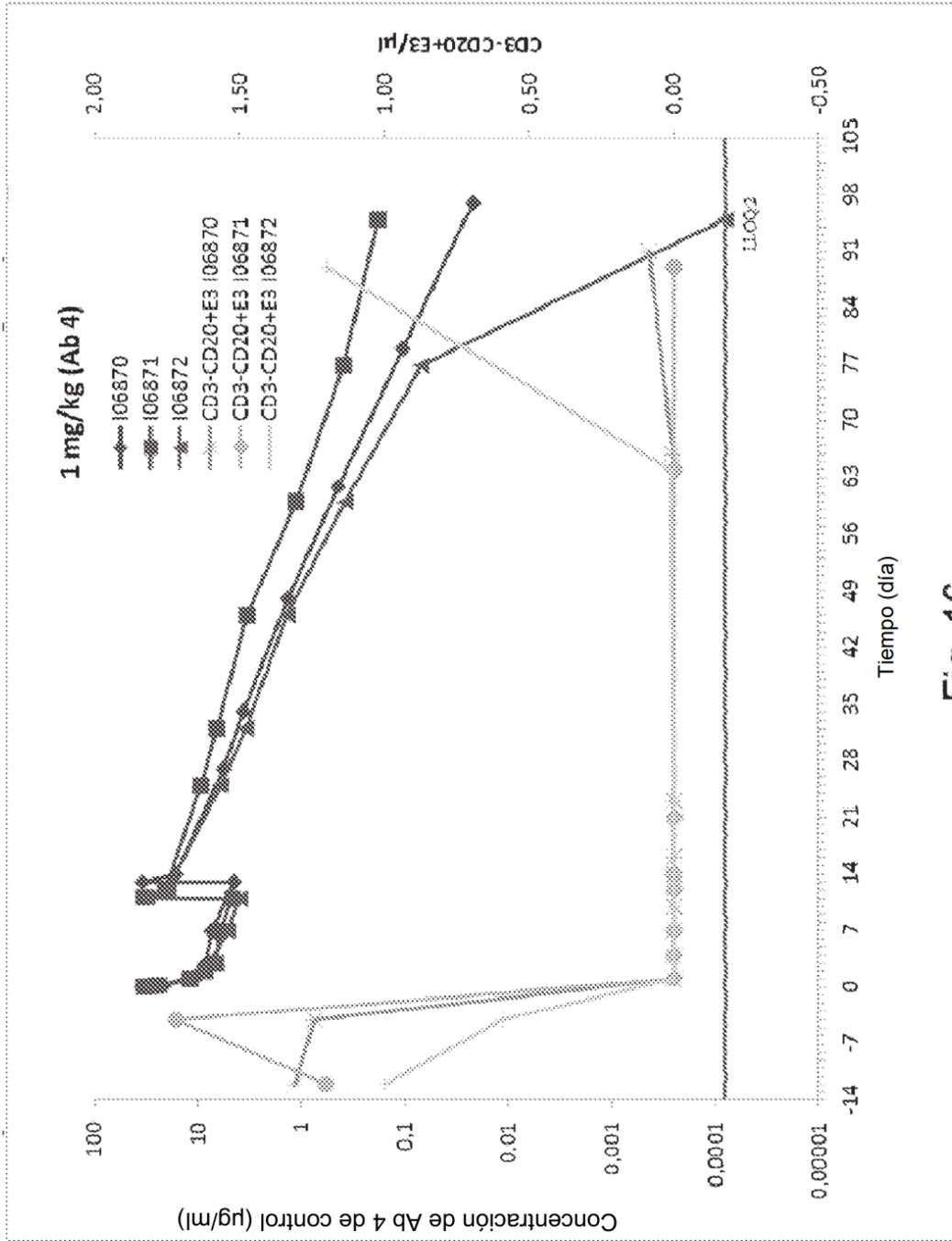


Fig. 16

CD3xCD20 Biespecificos muestran la capacidad para empobrecer linfocitos B en órganos linfoides

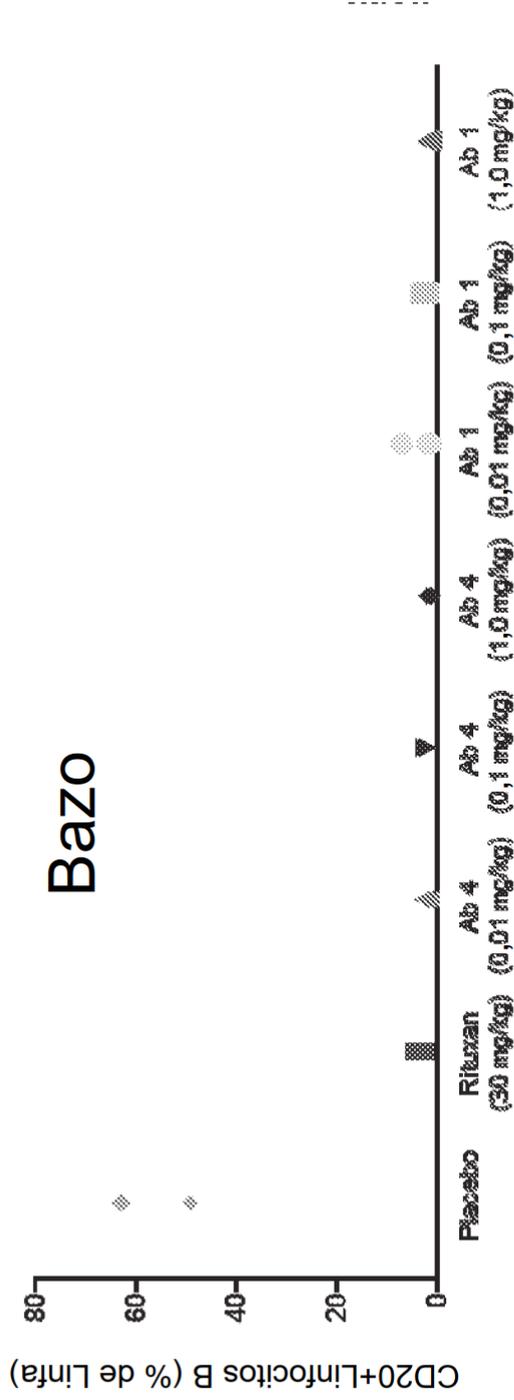


Fig. 17A

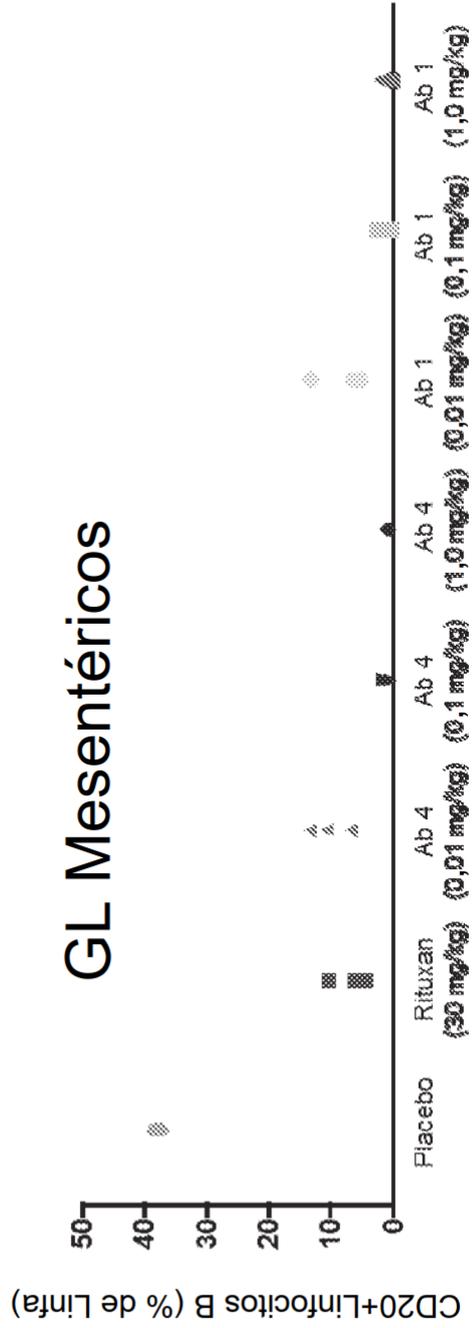


Fig. 17B

CD3xCD20 Biespecíficos inducen proliferación de linfocitos T *in vitro*

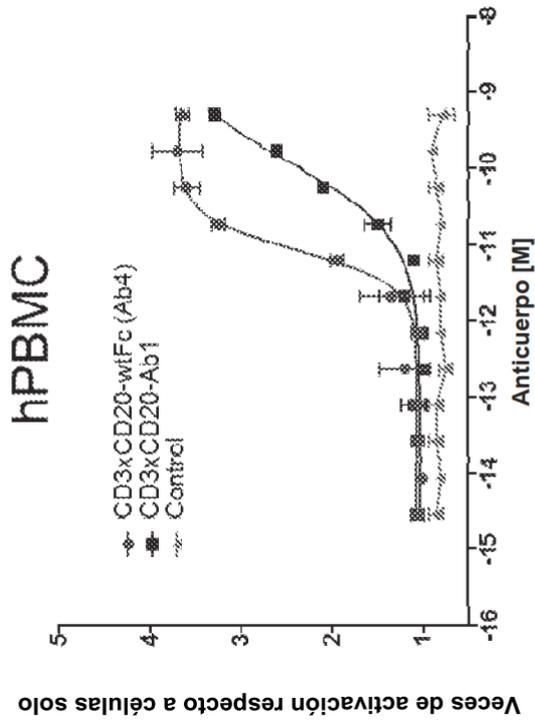


Fig. 18A

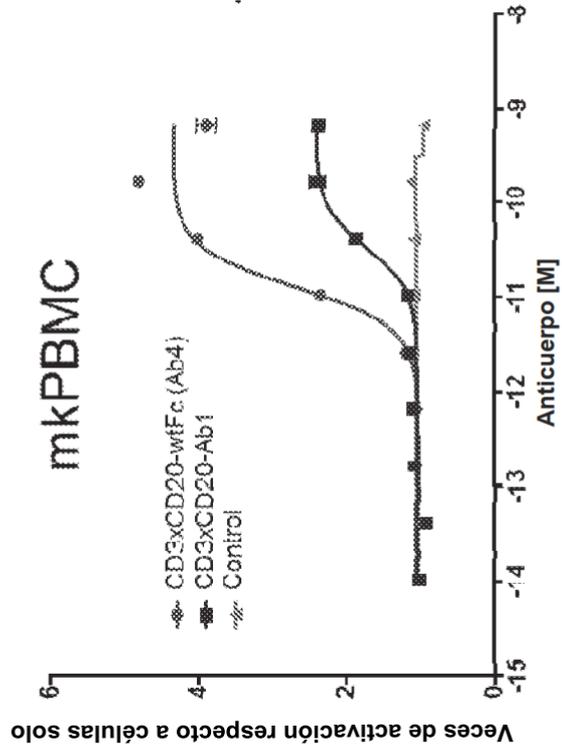


Fig. 18B

CD3xCD20 Biespecificos median la destrucción celular de linfocitos T activados *in vitro*

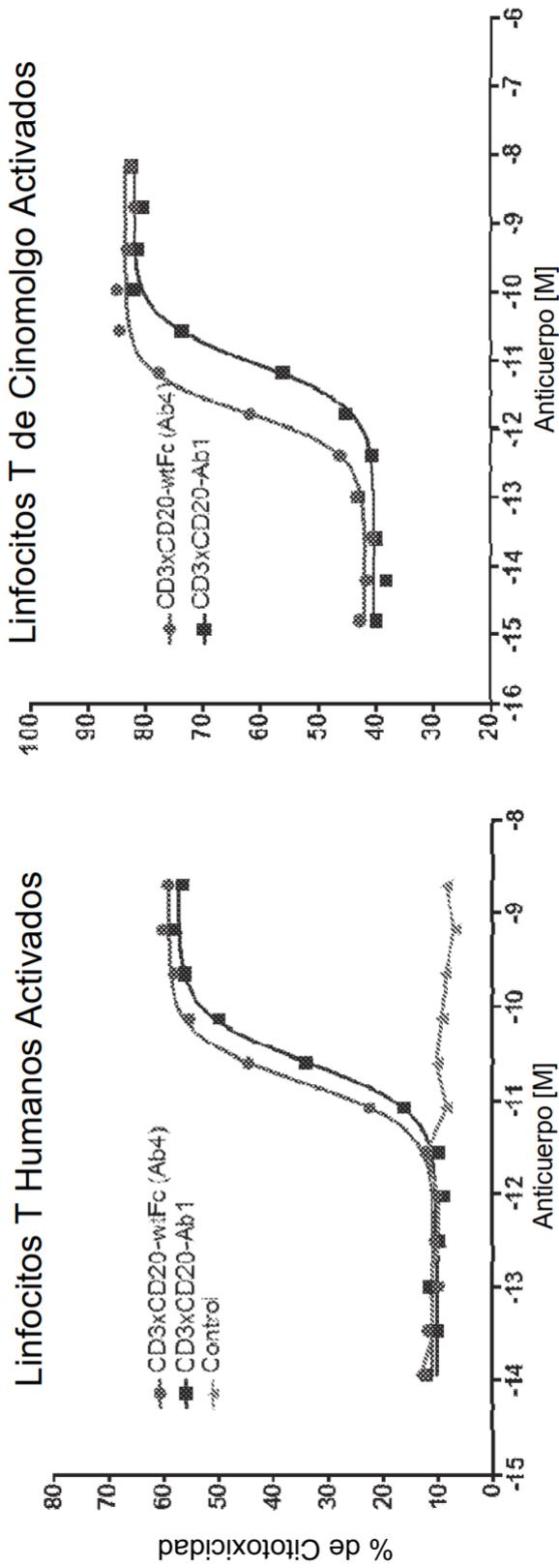
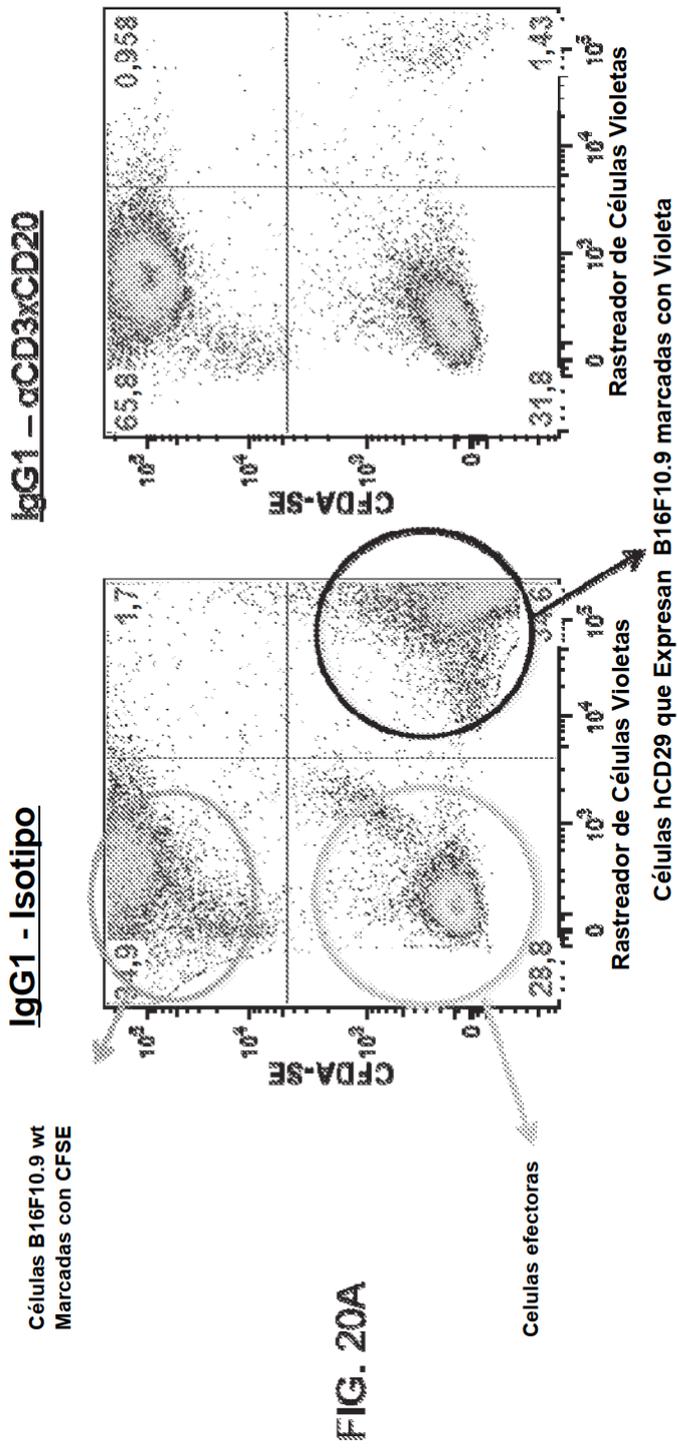
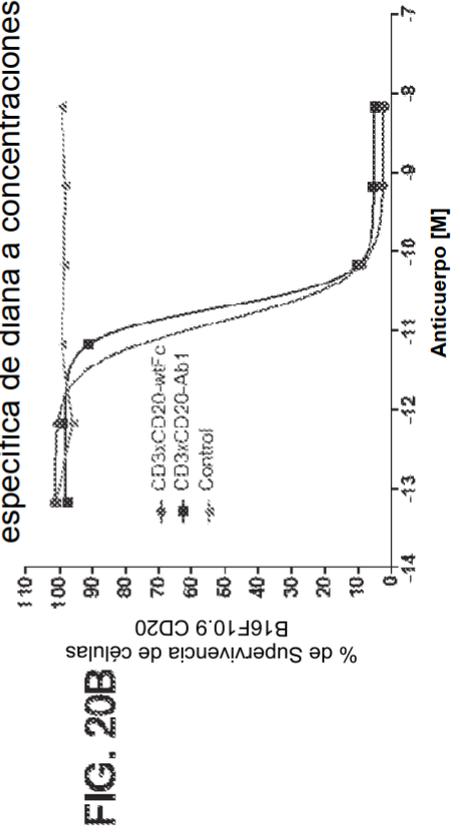


FIG. 19A

FIG. 19B



CD20 \times CD3 bispecificos dan como resultado destrucción específica de diana a concentraciones pM



Los marcadores de activación de linfocitos T son inducidos por tratamiento con Ab biespecífico

Regulación positiva de CD69 en un ensayo de Citotoxicidad de 48 horas de direccionamiento a células B16F10.9_CD20 cells

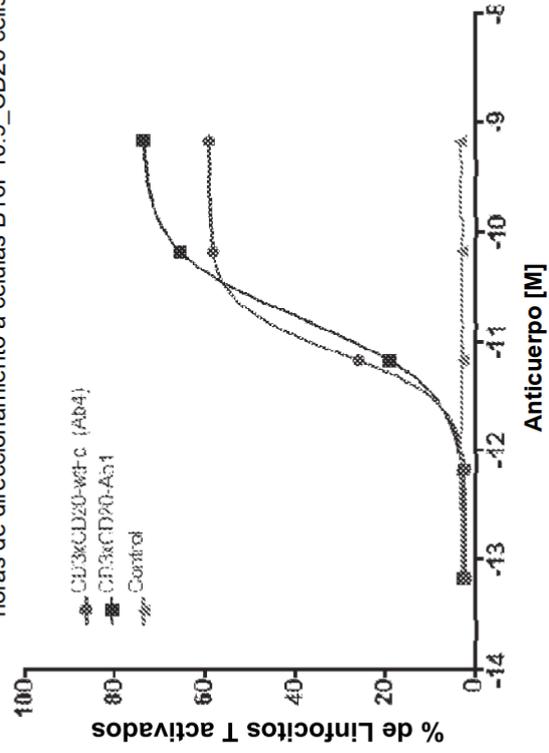


FIG. 21

CD20xCD3 biespecificos inducen agrupamiento de linfocitos T con células diana

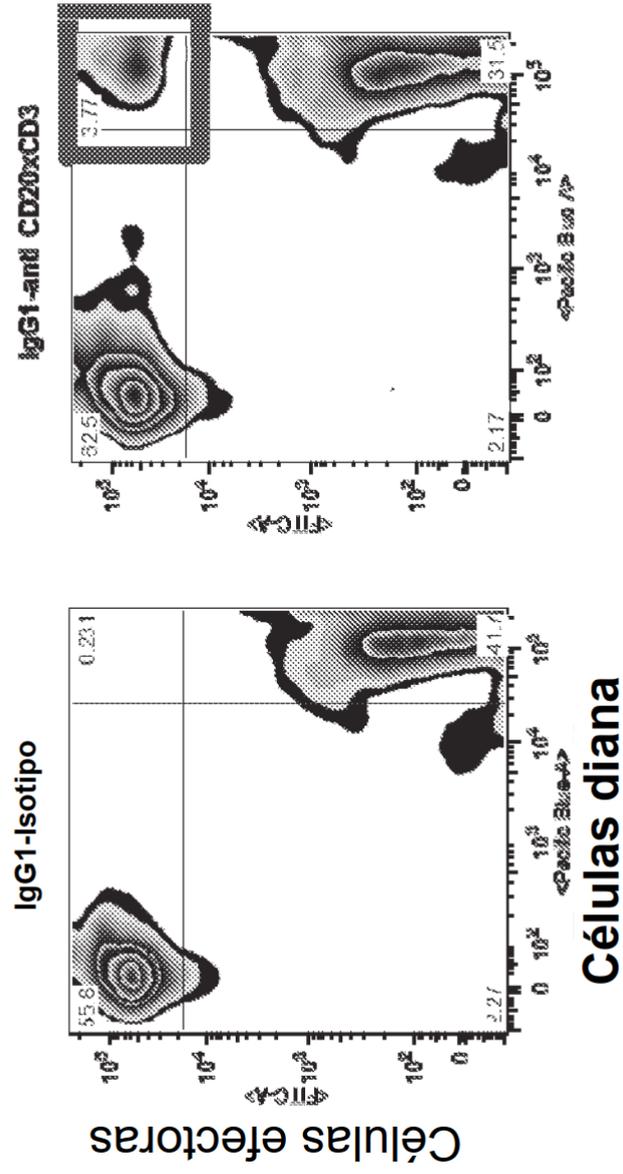
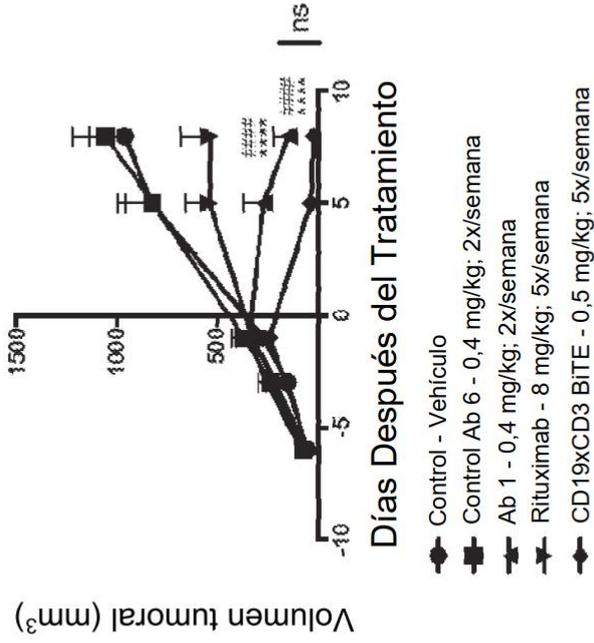


FIG. 22A

FIG. 22B

Tratamiento en ratones NSG con tumores Raji establecidos

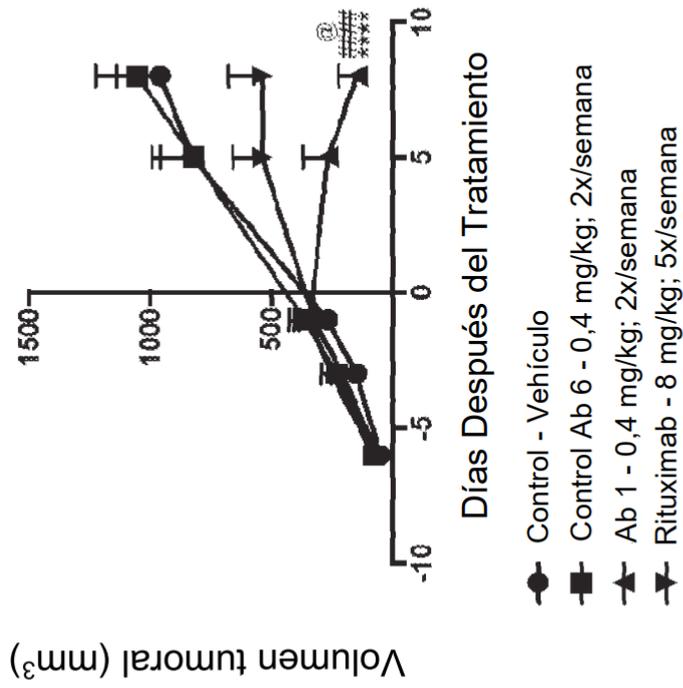


**** - en comparación con el control del vehículo; #### - en comparación con el control de Ab 6; @ - en comparación con rituximab; ns - no significativo

Los datos representan los datos compuestos de n = 4-6 ratones por grupo. Los datos se expresan como media (ETM) y se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) y ensayos post hoc para sondear efectos significativos (Tukey para ANOVA bidireccional). Dos ratones en el grupo..., y un ratón del grupo Ab 1 se excluyeron de este gráfico compuesto debido a muerte precoz para analizar datos mediante ANOVA bidireccional.

FIG. 23

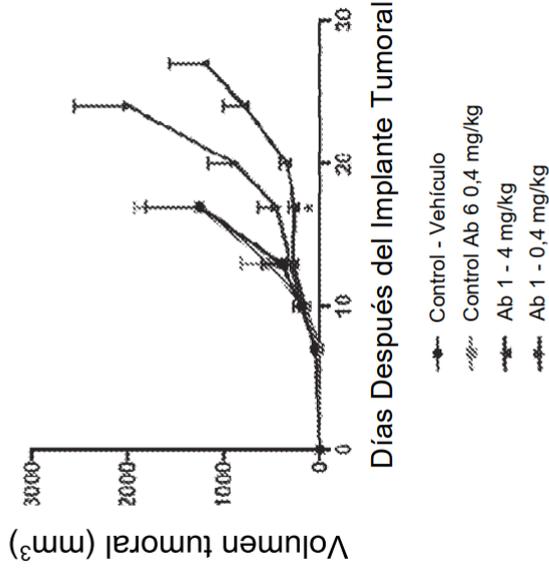
Tratamiento en ratones NSG con tumores Raji establecidos



**** - en comparación con el control del vehículo; ### - en comparación con el control de Ab 6; @ - en comparación con rituximab

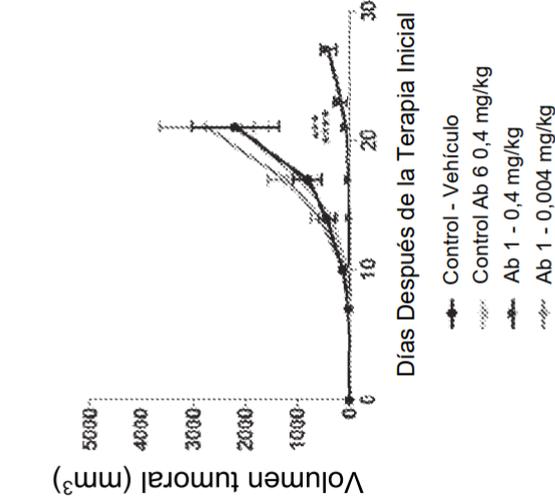
Los datos representan los datos compuestos de n = 4-6 ratones por grupo. Los datos se expresan como media (ETM) y se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) y ensayos post hoc para sondear efectos significativos (Tukey para ANOVA bidireccional). Un ratón del grupo Ab 1 se excluyó de este gráfico compuesto debido a muerte precoz para analizar datos mediante ANOVA bidireccional.

Tratamiento en ratones hCD3 implantados con tumores CD20/ B16F10.9



**** - en comparación con el vehículo; *** - en comparación con el control de Ab 6
Los datos representan los datos compuestos de n=5 ratones por grupo. Los datos se expresan como media (ETM) y se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) y ensayos post hoc para son-
dear efectos significativos (Tukey para ANOVA bidireccional).

FIG. 25A



* - en comparación con el vehículo y el control de anticuerpo
Los datos representan los datos compuestos de n=5 ratones por grupo. Los datos se expresan como media (ETM) y se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) y se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA).

FIG. 25B