

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 082**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/573** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 20170466 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024 EP 3736292**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD3 y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**17.12.2013 US 201361917346 P**  
**07.03.2014 US 201461949950 P**  
**18.07.2014 US 201462026594 P**  
**22.09.2014 US 201462053582 P**  
**12.12.2014 US 201462091441 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.11.2024**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco CA 94080-4490, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, XIAOCHENG;**  
**DENNIS, MARK S.;**  
**EBENS, ALLEN J. JR.;**  
**JUNTTILA, TEEMU T.;**  
**KELLEY, ROBERT F.;**  
**MATHIEU, MARY A. y**  
**SUN, LIPING L.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones:

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

ES 2 986 082 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD3 y procedimientos de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-grupo de diferenciación 3 (CD3) y a procedimientos de uso de los mismos.

10 **Antecedentes**

Los trastornos proliferativos celulares, tales como cáncer, se caracterizan por el crecimiento incontrolado de subpoblaciones celulares. Son la causa principal de muerte en el mundo desarrollado y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, con más de 12 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados y produciéndose 7 millones de muertes por cáncer cada año. El Instituto Nacional del Cáncer estima que más de medio millón de estadounidenses morirán de cáncer en 2013, lo que representa casi una de cada cuatro muertes en el país. A medida que la población anciana ha envejecido, la incidencia de cáncer ha aumentado simultáneamente, ya que la probabilidad de desarrollar cáncer es más de dos veces más alta después de los setenta años. Por tanto, la prevención y tratamiento del cáncer representa una carga social importante y cada vez mayor.

Los enfoques tradicionales para el tratamiento del cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia y cirugía para extirpar tumores sólidos. Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias basadas en anticuerpos biespecíficos. Dichos anticuerpos biespecíficos se pueden unir simultáneamente a antígenos en la superficie celular en células citotóxicas y células tumorales con la intención de que la célula citotóxica unida destruya la célula tumoral unida. El documento WO 2008/119566 divulga moléculas biespecíficas que se unen a CD3ε y, por ejemplo, HER2. El documento WO 2011/131746 describe proteínas que contienen anticuerpo heterodimérico-Fc, tales como anticuerpos biespecíficos que incluyen anticuerpos heterodiméricos anti-CD3xHER2 que contienen Fc. El documento WO2012/162067 describe moléculas de unión a CD3 de reactividad cruzada entre especies que son capaces de unirse a CD3 humana y no humana. Zhu et al. (1995) Int. J. Cancer 62 319-324 describe la ingeniería de F(ab)'s biespecíficos anti-p185HER2/anti-CD3 humanizados de alta afinidad y su uso en la lisis de células tumorales que sobreexpresan p185HER2. Los anticuerpos biespecíficos existentes que actualmente se someten a ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer están limitados por sus vidas medias cortas y/o su eficacia variable. Por tanto, existe una necesidad no satisfecha en el campo de desarrollo de anticuerpos biespecíficos eficaces para su uso en el tratamiento del cáncer.

**Sumario**

La materia objeto de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-grupo de diferenciación 3 (CD3) y a usos de los mismos como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo biespecífico, que comprende un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2, en el que: (a) el brazo anti-CD3 comprende un primer dominio de unión que comprende: (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184, en el que el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185, en el que el dominio VL comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (b) el brazo anti-HER2 comprende un segundo dominio de unión que comprende: (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 270, en donde el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171, y (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, en donde el dominio VL comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico se une a un epítipo en CD3 que comprende el residuo de aminoácido Glu6 de CD3. En determinados aspectos, el epítipo comprende además uno o más residuos de aminoácido adicionales seleccionados del grupo que consiste en Gln1, Asp2 y Met7 de CD3. En otro aspecto, el epítipo

comprende los residuos de aminoácido Gln1, Asp2 y Glu6 de CD3. En determinados aspectos, el epítipo comprende los residuos de aminoácido Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3. En otro aspecto, el epítipo no comprende el residuo de aminoácido Glu5 de CD3. En otro aspecto, el epítipo no comprende los residuos de aminoácido Gly3 y Glu5 de CD3. En determinados aspectos, el epítipo consiste en los residuos de aminoácido Gln1, Asp2, Glu6 y Met7 de CD3.

En algunos modos de realización, el dominio de unión de los anticuerpos biespecíficos se une a un polipéptido CD3 humano o a un polipéptido CD3 de macaco cangrejero. En algunos modos de realización, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3 $\epsilon$  humano o un polipéptido CD3 $\epsilon$  de macaco cangrejero, respectivamente. En algunos modos de realización, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 de macaco cangrejero es un polipéptido CD3 $\gamma$  humano o un polipéptido CD3 $\gamma$  de macaco cangrejero, respectivamente.

En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos pueden comprender una mutación del sitio de aglucosilación. En algunos modos de realización, la mutación del sitio de aglucosilación es una mutación por sustitución. En algunos modos de realización, la mutación por sustitución está en el residuo de aminoácido N297, L234, L235 y/o D265 (numeración EU). En algunos modos de realización, la mutación por sustitución se selecciona del grupo que consiste en N297G, N297A, L234A, L235A y D265A. En algunos modos de realización, la mutación por sustitución es una mutación N297G. En algunos modos de realización, la mutación del sitio de aglucosilación reduce la función efectora del anticuerpo biespecífico. En algunos modos de realización, la mutación del sitio de aglucosilación reduce la función efectora del anticuerpo biespecífico. En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo biespecífico comprende una mutación por sustitución en la región Fc que reduce la función efectora.

En algunos modos de realización, los anticuerpos biespecíficos pueden ser monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos. En algunos modos de realización, los anticuerpos biespecíficos pueden ser un fragmento de anticuerpo que se une a CD3. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')<sub>2</sub>. En otros modos de realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG (por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, o IgG3). En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico activador de linfocitos T (BiTE®).

En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico puede comprender uno o más dominios constantes de la cadena pesada, en el que el uno o más dominios constantes de la cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH1 (CH1<sub>1</sub>), un primer dominio CH2 (CH2<sub>1</sub>), un primer dominio CH3 (CH3<sub>1</sub>), un segundo dominio CH1 (CH1<sub>2</sub>), un segundo dominio CH2 (CH2<sub>2</sub>) y un segundo dominio CH3 (CH3<sub>2</sub>). En algunos modos de realización, al menos uno de los uno o más dominios constantes de la cadena pesada está emparejado con otro dominio constante de la cadena pesada. En algunos modos de realización, los dominios CH3<sub>1</sub> y CH3<sub>2</sub> comprenden cada uno una protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o cavidad en el dominio CH3<sub>1</sub> se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH3<sub>2</sub>. En algunos modos de realización, los dominios CH3<sub>1</sub> y CH3<sub>2</sub> se encuentran en una interfase entre dichas protuberancia y cavidad. En algunos modos de realización, los dominios CH2<sub>1</sub> y CH2<sub>2</sub> comprenden cada uno una protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o cavidad en el dominio CH2<sub>1</sub> se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH2<sub>2</sub>. En algunos modos de realización, los dominios CH2<sub>1</sub> y CH2<sub>2</sub> se encuentran en una interfase entre dichas protuberancia y cavidad.

En algunos modos de realización, la vida media de uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos precedentes puede ser de aproximadamente 7 días.

En algunos modos de realización, la invención presenta un inmunoconjugado que comprende los anticuerpos biespecíficos conjugados con un agente citotóxico. También se proporciona una composición que comprende los anticuerpos biespecíficos. En algunos modos de realización, la composición comprende además un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización, la composición es una composición farmacéutica. En algunos modos de realización, la composición comprende además un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente terapéutico adicional. En otro aspecto, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos biespecíficos divulgados en el presente documento, que comprende un vector (por ejemplo, un vector de expresión) para expresar el anticuerpo.

En otro aspecto, la invención presenta células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y/o vectores precedentes. En algunos modos de realización, la célula huésped es una célula de mamífero, (por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO)). En otros modos de realización, la célula huésped es una célula procarionte (por ejemplo, una célula de *E. coli*). También se proporciona un procedimiento para producir uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos precedentes, comprendiendo el procedimiento cultivar la célula huésped que produce el anticuerpo biespecífico y recuperar el anticuerpo biespecífico de la célula huésped o del medio de cultivo.

En algunos aspectos, se pueden usar los anticuerpos biespecíficos como medicamento. En algunos modos de

realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para tratar o retrasar la progresión de un trastorno proliferativo celular en un sujeto que lo necesita. En algunos modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para potenciar la función inmunitaria en un sujeto que tiene un trastorno de proliferación celular.

5 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de un trastorno proliferativo celular o un trastorno autoinmune en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos precedentes. En otro aspecto, la invención presenta uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos precedentes para su uso en un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular o un trastorno autoinmunitario, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto dichos anticuerpos biespecíficos. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico se une a (a) una molécula CD3 localizada en una célula efectora inmunitaria y (b) una segunda molécula biológica localizada en una célula diana distinta de la célula efectora inmunitaria. En algunos modos de realización, la segunda molécula biológica es una molécula de HER2. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico activa la célula efectora inmunitaria tras la unión a (a) y (b). En algunos modos de realización, la célula efectora inmunitaria activada puede ejercer un efecto citotóxico y/o un efecto apoptótico sobre la célula diana. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico se administra al sujeto a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico se administra al sujeto a una dosificación de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico se administra al sujeto en una dosificación de aproximadamente 1 mg/kg. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico se administra por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico se administra por vía subcutánea. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico se administra por vía intravenosa.

25 En otros modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente terapéutico adicional. En algunos modos de realización, el agente terapéutico adicional se administra antes o después de la administración del anticuerpo biespecífico. En algunos modos de realización, el agente terapéutico adicional se administra simultáneamente con el anticuerpo biespecífico. En algunos modos de realización, el antagonista de unión al eje de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-L2. En algunos modos de realización, el antagonista de unión al eje PD-1 es un antagonista de unión a PD-1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX-1106 (nivolumab), MK-3475 (lambrolizumab), CT-011 (pidilizumab) y AMP-224. En otros modos de realización, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en: MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736. En otros modos de realización, el antagonista de unión al eje de PD-1 es un antagonista de unión a PD-L2. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-L2 es un anticuerpo o una inmunoadhesina.

40 En algunos aspectos, la invención presenta los anticuerpos biespecíficos de la invención para su uso en un procedimiento para tratar o retrasar la progresión de un trastorno proliferativo celular en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico y un antagonista de unión al eje de PD-1, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2. En algunos aspectos, la invención presenta un anticuerpo biespecífico de la invención para su uso en un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto un anticuerpo biespecífico y un antagonista de unión al eje PD-1, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2 (es decir, un TDB frente a HER2). En algunos modos de realización, (a) el brazo anti-CD3 comprende un primer dominio de unión que comprende (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184, en el que el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185, en el que el dominio VL comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (b) el brazo anti-HER2 comprende un segundo dominio de unión que comprende (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 270, en el que el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171, y (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, en el que el dominio VL comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174; y/o (c) el antagonista de unión al eje PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1.

5 En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un brazo anti-HER2 que comprende una mutación por sustitución N297G. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un brazo anti-CD3 que comprende mutaciones por sustitución T366S, L368A, Y407V y/o N297G y un brazo anti-HER2 que comprende mutaciones por sustitución N297G, N297A, L234A, L235A y/o D265A. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un brazo anti-CD3 que comprende una mutación por sustitución N297G. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un brazo anti-HER2 que comprende mutaciones por sustitución T366S, L368A, Y407V y/o N297G y un brazo anti-CD3 que comprende mutaciones por sustitución N297G, N297A, L234A, L235A y/o D265A.

10 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto uno o más agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a la vía de HER. En algunos modos de realización, los uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de trastuzumab, T-DM1 y pertuzumab. En algunos modos de realización, el agente terapéutico adicional es trastuzumab.

15 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto un glucocorticoide. En algunos modos de realización, el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisolona, prednisona, metilprednisona, triamcinolona, parametasona, betametasona, fludrocortisona y ésteres, sales y complejos farmacéuticamente aceptables de las mismas. En algunos modos de realización, el glucocorticoide es dexametasona. En algunos modos de realización, el glucocorticoide es un éster, sal o complejo farmacéuticamente aceptable de dexametasona.

20 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto rituximab.

25 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto obinutuzumab.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al sujeto un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

30 En cualquiera de los usos precedentes, el trastorno proliferativo celular puede ser cáncer. En algunos modos de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, carcinoma de pulmón no microcítico, linfoma no hodgkiniano (NHL), linfoma de linfocitos B, leucemia de linfocitos B, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, glioblastoma, LDCBG de tipo linfocitos B del centro germinal (GCB), LDCBG de tipo linfocitos B activados (ABC), linfoma folicular (FL), células del manto linfoma (MCL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células pilosas, linfoma/leucemia esplénica, inclasificable, linfoma esplénico de linfocitos B pequeños de pulpa roja difusa, variante de leucemia de células pilosas, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de la cadena pesada, enfermedad de la cadena pesada  $\alpha$ , enfermedad de la cadena pesada  $\gamma$ , enfermedad de la cadena pesada  $\mu$ , mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma solitario óseo, plasmacitoma extraóseo, linfoma extraganglionar de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT), linfoma ganglionar de la zona marginal, linfoma pediátrico de la zona marginal ganglionar, linfoma folicular pediátrico, linfoma cutáneo primario del centro del folículo, linfoma de linfocitos B grandes rico en linfocitos T/histiocitos, DLBCL primario del SNC, DLBCL cutáneo primario, tipo de pierna, DLBCL positivo para EBV en ancianos, DLBCL asociado con inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes positivo para ALK, linfoma plasmablastico, linfoma de linfocitos B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrico asociado a HHV8, linfoma de derrame primario: Linfoma de linfocitos B, inclasificable, con rasgos característicos intermedios entre el linfoma difuso de linfocitos B grandes y el linfoma de Burkitt, y linfoma de linfocitos B, inclasificable, con rasgos característicos intermedios entre el linfoma difuso de linfocitos B grandes y el linfoma hodgkiniano clásico. En algunos modos de realización, el cáncer preferido es DLBCL tipo linfocitos B de centro germinal (GCB), DLBCL de tipo linfocitos B activados (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL) o linfoma de Burkitt (BL). En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer positivo para HER2. En algunos modos de realización, el cáncer positivo para HER2 es un cáncer de mama positivo para HER2 o un cáncer gástrico positivo para HER2.

60 En otro aspecto, la presente divulgación presenta un kit que comprende: (a) una composición que comprende una cualquiera de los anticuerpos biespecíficos precedentes y (b) un prospecto del envase que comprende instrucciones para administrar la composición a un sujeto para tratar o retrasar la progresión de un trastorno proliferativo celular.

65 En cualquiera de los usos precedentes, el sujeto puede ser un ser humano.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 La FIGURA 1 muestra la secuencia de aminoácidos de CD3εγ humano monocatenario con una secuencia conectora de 26 unidades usada en experimentos de mapeo de epítotos de CD3 (SEQ ID NO: 282).
- 10 La FIGURA 2A es una tabla que resume la caracterización de clones de hibridoma seleccionados. La tabla resume los resultados de los experimentos de unión de CD3 ELISA usando CD3ε<sup>1-27</sup>-Fc humano y de macaco cangrejero; experimentos de unión de FACS usando linfocitos T Jurkat humanos, PBMC humanas y PBMC de macaco cangrejero; experimentos de activación de linfocitos T mediante análisis por FACS; y experimentos de determinación de isotipos.
- 15 La FIGURA 2B es una tabla que resume las afinidades de unión (valores Kd) de clones de hibridoma seleccionados para un antígeno CD3εγ humano comercial.
- 20 La FIGURA 3A es una tabla que resume la caracterización de hibridoma seleccionado. La tabla resume los resultados de los experimentos de unión de CD3 ELISA usando CD3ε<sup>1-27</sup>-Fc humano y de macaco cangrejero; experimentos de unión de FACS usando linfocitos T Jurkat humanos, PBMC humanas y PBMC de macaco cangrejero; experimentos de activación de linfocitos T mediante análisis por FACS; y experimentos de determinación de isotipos.
- 25 Las FIGURAS 3B y 3C son tablas que resumen las afinidades de unión (valores Kd) de clones de hibridoma seleccionados.
- 30 La FIGURA 4A muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3. Las secuencias de HVR están delimitadas por los recuadros indicados para cada uno de los anticuerpos.
- La FIGURA 4B muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.
- La FIGURA 4C muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.
- 35 La FIGURA 5A muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena ligera de los anticuerpos anti-CD3.
- La FIGURA 5B muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada de los anticuerpos anti-CD3.
- 40 La FIGURA 6A muestra las secuencias de aminoácidos para los dominios variables de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 21A9, y Rab17.
- 45 La FIGURA 6B muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 21A9, y Rab17.
- 50 La FIGURA 7 es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) de anticuerpos anti-CD3 que muestran la secuencia consenso, 40G5c, derivada de los anticuerpos clonales relacionados.
- La FIGURA 8A es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD3 13A3 y una variante humanizada del mismo (hu13A3).
- 55 La FIGURA 8B es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD3 30A1 y una variante humanizada del mismo (hu30A1).
- 60 La FIGURA 8C es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD3 41D9a y una variante humanizada del mismo (hu41D9a).
- 65 La FIGURA 8D es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD3 SP34 y una variante humanizada del mismo (huSP34).

- La FIGURA 8E es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD3 38E4 y una variante humanizada del mismo (hu38E4).
- 5 La FIGURA 8F es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD3 40G5 y una variante humanizada del mismo (hu40G5).
- 10 La FIGURA 9A es una tabla que resume variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 13A3 y sus afinidades de unión, analizadas usando CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; número de catálogo CD3E-2194H).
- 15 La FIGURA 9B es una tabla que resume variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 30A1 y sus afinidades de unión, analizadas usando CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; número de catálogo CD3E-2194H).
- 20 La FIGURA 9C es una tabla que resume variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 41D9a y sus afinidades de unión, analizadas usando CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; número de catálogo CD3E-2194H).
- 25 La FIGURA 9D es una tabla que resume variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 SP34 y sus afinidades de unión, analizadas usando CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; número de catálogo CD3E-2194H).
- 30 La FIGURA 9E es una tabla que resume variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 38E4 y sus afinidades de unión, analizadas usando CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; número de catálogo CD3E-2194H).
- 35 La FIGURA 9F es una tabla que resume variantes humanizadas seleccionadas del anticuerpo anti-CD3 40G5c y sus afinidades de unión, analizadas usando CD3ε comercial (Creative Biomart, Shirley, NY; número de catálogo CD3E-2194H).
- La FIGURA 10 es una tabla que resume la afinidad de unión de anticuerpos anti-CD3 humanizados por diversos antígenos CD3ε.
- 40 La FIGURA 11 es una tabla que resume la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD3 humanizados 38E4v1 a 38E4v9 y 40G5c, medida por Biacore con CD3ε humano en el chip y anticuerpos anti-CD3 en flujo continuo.
- 45 La FIGURA 12A es una tabla que resume las afinidades de unión relativas para mutantes únicos de alanina, serina, treonina o glutamato del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4v1 que tiene una única mutación en HVR-L3 o HVR-H3, en comparación con 38E4v1 que usa un análisis Biacore cinético de único ciclo o multiciclo convencional.
- La FIGURA 12B muestra las secuencias de aminoácidos HVR-L3 (arriba) y HVR-H3 (abajo) del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4v1.
- 50 La FIGURA 13A es una serie de gráficos que muestran la unión relativa del anticuerpo anti-CD3 indicado a variantes de alanina de CD3ε<sup>1-27</sup>-Fc.
- 55 La FIGURA 13B es un gráfico que muestra la fracción relativa de mutantes de fagémido de exploración de alanina CD3ε y unidos a anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52, en comparación con la unión al fago CD3ε y natural.
- La FIGURA 13C es una serie de gráficos que muestran la unión relativa de los anticuerpos anti-CD3 38E4.v1, 40G5c y SP34.v52 a mutantes fagémidos de exploración de alanina CD3ε seleccionados como una función de la concentración de fagos.
- 60 La FIGURA 13D es un conjunto de tablas que muestran las afinidades de unión relativas de los anticuerpos anti-CD3 SP34.v52 y 38E4v1 a mutantes de exploración de alanina CD3ε seleccionados, como se ha evaluado por Biacore. NB = sin unión detectable.
- 65 La FIGURA 14A muestra la secuencia del polipéptido CD3ε de 16 unidades usado en ensayos de cocrystalización con Fab 38E4.v1.
- Las FIGURAS 14B-14F son una serie de representaciones de la estructura cristalina que muestran diferentes vistas del complejo peptídico Fab hu38E4.v1/CD3ε.

- La FIGURA 14G es una alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) de los anticuerpos anti-CD3 hu40G5c y hu38E4.v1, con los residuos de cada anticuerpo que son importantes para la unión de CD3 (residuos de contacto) rodeados en la alineación. Se encontró que los residuos rodeados estaban dentro de los 5 Å del péptido CD3, como se determina mediante análisis cristalográfico. Δ denota posiciones de vernier (como referencia, véase, por ejemplo, Foote y Winter. *JMB.* 224: 487, 1992); \* indica interacciones FW-HVR (como referencia, véase, por ejemplo, Padlan et al. *Mol. Immunol.* 31: 169, 1994); y • indica interacciones VH-VL (como referencia, véase, por ejemplo, Padlan et al. *Mol. Immunol.* 31: 169, 1994).
- La FIGURA 14H es una representación de la estructura cristalina del polipéptido CD3ε unido por Fab hu38E4.v1. Todos los residuos de contacto con el antígeno se representan en amarillo. Todos los residuos de contacto son idénticos entre hu38E4.v1 y hu40G5, excepto que G96 (representado en naranja) es S96 en hu40G5.
- Las FIGURAS 14I y 14J son representaciones de diagramas de cinta de las estructuras cristalinas de Fab hu38E4.v1 y Fab SP34v52, respectivamente, en la misma orientación, superpuestas con la región VL con un RMS = 2,24.
- La FIGURA 14K es una representación de un modelo espacial del Fab hu38E4.v1 complejado con el péptido N-terminal CD3ε unido en la hendidura entre las cadenas pesada (cian) y ligera (púrpura).
- La FIGURA 14L es una representación del modelo que llena el espacio del Fab SP34v52 con el péptido N-terminal CD3ε superpuesto en la misma orientación que en el complejo Fab CD3ε/hu38E4.v1 representado en la figura 14K. Los residuos R50 y R52 (en naranja) de HVR-H2 del Fab SP34v52 son importantes para la unión de CD3. Los choques claros del péptido CD3 con Fab SP34v52 se indican mediante flechas.
- La FIGURA 14M es una representación de la estructura cristalina del hu38E4.v1 complejado con el péptido N-terminal de CD3εγ e ilustra las interacciones intermoleculares clave implicadas en el primer residuo de piroglutamina y el sexto residuo (E6) en CD3εγ. Los enlaces de hidrógeno potenciales se muestran como líneas discontinuas.
- La FIGURA 14N es una representación de un modelo espacial del Fab hu38E4.v1 complejado con el péptido N-terminal CD3εγ unido en la hendidura entre las cadenas pesada (cian) y ligera (púrpura). El quinto residuo (E5), como se ilustra, apunta en dirección opuesta al sitio interactivo que contiene el sexto residuo (E6) del péptido N-terminal CD3εγ y el complejo Fab.
- La FIGURA 15 representa una generalización esquemática de la formación de anticuerpos TDB. El TDB particular representado se muestra como un TDB de longitud completa en formato de botón en ojal (KIH), que puede poseer una mutación de aglucosilación, si es producida por una célula eucariota (por ejemplo, una célula CHO). En un formato alternativo, el botón puede estar presente en el brazo anti-CD3 y el ojal puede estar presente en el brazo de antígeno antitumoral. Este formato también puede poseer una mutación de aglucosilación, si es producido por una célula eucariota (por ejemplo, una célula CHO).
- La FIGURA 16 son gráficos que muestran los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de varios TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 de la serie UCHT1 y brazos anti-CD20 de la serie 2H7. Unión de la línea celular tumoral Bjab B (unión a CD20), izquierda. Unión de células Jurkat (unión a CD3), derecha.
- La FIGURA 17 es un conjunto de tablas que resumen las afinidades de unión monovalente (superior) y (bivalente) como valores de Kd para diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 de la serie UCHT1 y brazos anti-CD20 de la serie 2H7.
- La FIGURA 18 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de células Jurkat (unión a CD3) de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.
- La FIGURA 19 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de células Jurkat (unión a CD3) de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.
- La FIGURA 20 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de células Bjab (unión a CD20) de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.
- Las FIGURAS 21A y 21B son gráficos que muestran los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de células Jurkat (unión a CD3) de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

La FIGURA 21C es una tabla que resume la CE50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 21A y 21B.

5 Las FIGURA 22A y 22B son gráficos que muestran los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de células Bjab (unión a CD20) de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

10 La FIGURA 23 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de unión FACS *in vitro* de células Jurkat (unión a CD3) de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.

15 La FIGURA 24 es una tabla que resume las afinidades de unión para diversos TDB y Fab CD3/CD20, medidas mediante análisis Biacore con CD3 $\epsilon\gamma$  humano en chip y TDB frente a CD3/CD20 o Fab en flujo continuo.

La FIGURA 25A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y linfocitos T hu CD8+ purificados x5.

20 La FIGURA 25B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab en relación con un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie 2H7) con 20.000 células Bjab y linfocitos T huCD8+ purificados x5, medido por análisis por FACS.

25 La FIGURA 26A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie 2H7) con 200.000 PBMC humanas por pocillo.

30 La FIGURA 26B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endógenos (endo) con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie 2H7) con 200.000 PBMC humanas por pocillo, medido por análisis por FACS.

35 La FIGURA 27A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y linfocitos T hu CD8+ purificados x5.

La FIGURA 27B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de Bjab en relación con un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie UCHT1) con 20.000 células Bjab y linfocitos T huCD8+ purificados x5, medido por análisis por FACS.

40 La FIGURA 28A es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie UCHT1) con 200.000 PBMC humanas por pocillo.

45 La FIGURA 28B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de TDB frente a CD3/CD20 especificado (serie UCHT1) con 200.000 PBMC humanas por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

50 La FIGURA 29A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 3) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

55 La FIGURA 29B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 3) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

60 La FIGURA 30A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 4) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

65 La FIGURA 30B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 4) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

5 La FIGURA 31A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC de macaco cangrejero (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

10 La FIGURA 31B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC de macaco cangrejero (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

15 La FIGURA 32A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC de macaco cangrejero (aisladas del donante n.º 3) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

20 La FIGURA 32B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC de macaco cangrejero (aisladas del donante n.º 3) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

25 La FIGURA 33A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células B<sub>jab</sub> con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC de macaco cangrejero por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

30 La FIGURA 33B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC de macaco cangrejero por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

35 La FIGURA 34A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

40 La FIGURA 34B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

45 La FIGURA 35A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 3) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

50 La FIGURA 35B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 3) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

55 La FIGURA 36A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 4) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

60 La FIGURA 36B es un gráfico que muestra el porcentaje de activación de linfocitos T, medido por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 4) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

65 Las FIGURAS 37A y 37B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de linfocitos T, medida por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 1) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.

- La FIGURA 37C es una tabla que resume la CE50 para la activación de linfocitos T CD8+ (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 37A y 37B.
- 5 Las FIGURAS 38A y 38B son gráficos que muestran el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 1) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 10 La FIGURA 38C es una tabla que resume la CE50 para la destrucción de linfocitos T endo (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 38A y 38B.
- 15 Las FIGURAS 39A y 39B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de linfocitos T, medida por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 48 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 1) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 20 La FIGURA 39C es una tabla que resume la CE50 para la activación de linfocitos T CD8+ (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 39A y 39B.
- 25 Las FIGURAS 40A y 40B son gráficos que muestran el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 48 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 1) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 30 La FIGURA 40C es una tabla que resume la CE50 para la destrucción de linfocitos T endo (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 40A y 40B.
- 35 Las FIGURAS 41A y 41B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de linfocitos T, medida por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 40 La FIGURA 41C es una tabla que resume la CE50 para la activación de linfocitos T CD8+ (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 41A y 41B.
- 45 Las FIGURAS 42A y 42B son gráficos que muestran el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 24 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 50 La FIGURA 42C es una tabla que resume la CE50 para la destrucción de linfocitos T endo (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 42A y 42B.
- 55 Las FIGURAS 43A y 43B son gráficos que muestran el porcentaje de activación de linfocitos T, medida por la expresión en superficie de CD69 y CD25, después de 48 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 60 La FIGURA 43C es una tabla que resume la CE50 para la activación de linfocitos T CD8+ (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 43A y 43B.
- 65 Las FIGURAS 44A y 44B son gráficos que muestran el porcentaje de destrucción de linfocitos B endo con respecto a un control no tratado con TDB, después de 48 horas de incubación de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16, con 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- La FIGURA 44C es una tabla que resume la CE50 para la destrucción de linfocitos T endo (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba en las figuras 44A y 44B.
- La FIGURA 45A es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no exhiben potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de Bjab.
- Las FIGURAS 45B y 45C son gráficos que muestran que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 72H6, no exhiben potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de linfocitos B endo (B) y activación de linfocitos T (C).

- 5 La FIGURA 46A es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 13A3, exhiben baja potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de Bjab.
- 10 La FIGURA 46B es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 30A1, exhiben baja potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de Bjab.
- 15 La FIGURA 46C es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, exhiben baja potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de Bjab. Se muestran los valores de CE50 para la destrucción de células Bjab (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba.
- 20 La FIGURA 46D es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, exhiben baja potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de linfocitos B endo. Se muestran los valores de CE50 para la destrucción de linfocitos T endo (ng/ml) para cada TDB frente a CD3/CD20 sometido a prueba.
- 25 La FIGURA 46E es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como uno que tiene un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de 41D9a, exhiben baja potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de activación de linfocitos B.
- 30 La FIGURA 47A es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como TDB que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, exhiben alta potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de linfocitos B endo usando 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 1) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 35 La FIGURA 47B es un gráfico que muestra que ciertos TDB frente a CD3/CD20, tales como TDB que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, exhiben alta *in vitro* potencia, evaluado mediante ensayos de activación de linfocitos T usando 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 1) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 40 La FIGURA 48A es un gráfico que muestra que determinados TDB frente a CD3/CD20, tales como TDB que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, exhiben alta potencia *in vitro*, evaluado mediante ensayos de destrucción de linfocitos B endo usando 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 45 La FIGURA 48B es un gráfico que muestra que ciertos TDB frente a CD3/CD20, tales como TDB que tienen un brazo anti-CD20 de 2H7v16 y un brazo anti-CD3 de UCHT1v9, 21A9 y 40G5c, exhiben alta *in vitro* potencia, evaluado mediante ensayos de activación de linfocitos T usando 200.000 PBMC humanas (aisladas del donante n.º 2) por pocillo, medido mediante análisis por FACS.
- 50 La FIGURA 49 es una tabla que resume las potencias *in vitro* de diversos TDB frente a CD3/CD20 que tienen diferentes combinaciones de brazos anti-CD3 con el brazo anti-CD20 de 2H7v16.
- 55 La FIGURA 50 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD20 2H7.v16.
- 60 La FIGURA 51 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-CD3 hu40G5c.
- 65 Las FIGURAS 52A y 52B muestran que TDB frente a CD3/CD20 (40G5c/2H7v16) purificado no tiene formación de agregados detectable como se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (A) y no tiene formación de homodímero detectable (es decir, formación de anticuerpo CD3/CD3 o CD20/CD20) evaluado por espectrometría de masas (B).
- La FIGURA 53A es un gráfico que muestra la farmacocinética de las concentraciones séricas de TDB frente a CD3/CD20 en dosis variables en ratas Sprague Dawley (SD) a lo largo del tiempo (en días), evaluado mediante farmacocinética de inmunoglobulina genérica (GRIP) o ensayo específico.
- La FIGURA 53B es una tabla que resume los valores de eliminación cuantificados (ml/día/kg) de los anticuerpos TDB frente a CD3/CD20 analizados en cada dosificación analizada en la figura 53A.
- La FIGURA 54A es un gráfico que muestra que la parte F(ab')<sub>2</sub> de TDB frente a CD20 conservó la misma potencia que la IgG TDB frente a CD20 de longitud completa en la destrucción de linfocitos B (destrucción de Bjab) *in vitro*.

Se incubaron 20.000 células B<sub>jab</sub> y 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 de longitud completa o F(ab')<sub>2</sub> TDB frente a CD20 durante 24 horas.

5 La FIGURA 54B es un gráfico que muestra que la actividad de destrucción de linfocitos B de TDB frente a CD20 depende de los linfocitos T, ya que no se detectó destrucción de linfocitos B con PBMC disminuidas en linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Se incubaron 20.000 células B<sub>jab</sub> y 200.000 PBMC aisladas de un donante sano, o 200.000 PBMC disminuidas en linfocitos T CD3<sup>+</sup>, con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 24 horas.

10 La FIGURA 54C es un gráfico que muestra que se puede lograr una destrucción de linfocitos B comparable con linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> como efectores. Se incubaron 20.000 células B<sub>jab</sub> y 100.000 linfocitos T CD8<sup>+</sup> o linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de linfocitos T marcados como CD69+CD25<sup>+</sup> se midieron y calcularon como se describe a continuación.

15 La FIGURA 54D es un gráfico que muestra que TDB frente a CD20 es capaz de activar linfocitos T tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Se incubaron 20.000 células B<sub>jab</sub> y 100.000 linfocitos T CD8<sup>+</sup> o linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 24 horas. La destrucción celular y la activación de linfocitos T marcados como CD69+CD25<sup>+</sup> se midieron y calcularon como se describe a continuación.

20 La FIGURA 54E es un gráfico que muestra que la regulación por incremento de granzima es más prevalente dentro de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tras la adición de TDB frente a CD20. Se incubaron 20.000 células B<sub>jab</sub> y 100.000 linfocitos T CD8<sup>+</sup> o linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 24 horas. Mediante FACS también se detectó la inducción de granzima B.

25 La FIGURA 54F es un gráfico que muestra que un mayor nivel de liberación de perforina está asociado con linfocitos T CD8<sup>+</sup> tras la adición de TDB frente a CD20. Se incubaron 20.000 células B<sub>jab</sub> y 100.000 linfocitos T CD8<sup>+</sup> o linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 24 horas. La concentración de perforina en los medios se midió mediante ELISA.

30 La FIGURA 55 es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que los linfocitos T activados son capaces de proliferar en presencia de células TDB frente a CD20 y B<sub>jab</sub>.

35 La FIGURA 56A es una serie de gráficos que muestran las curvas de destrucción de linfocitos B dosis-respuesta de 8 líneas de linfocitos B tumorales de leucemia/linfoma (izquierda) y los niveles de expresión de CD20 para las líneas de linfocitos B dadas con un control de isotipo en gris, medido por FACS. Se cultivaron linfocitos B en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 linfocitos B con 200.000 PBMC aisladas de un donante sano con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 24 horas.

40 La FIGURA 56B es un gráfico que muestra un amplio intervalo en la expresión media de CD20 en las 8 líneas de linfocitos B analizados en la figura 56A. Se incubaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup>, purificados a partir de sangre completa de un donante sano y marcados con CFSE, solos, solo con B<sub>jab</sub>, solo con TDB frente a CD20 o con B<sub>jab</sub> y TDB frente a CD20 durante 24 horas primero, a continuación las células se lavaron y se pusieron en medio fresco durante otras 48 horas. Mediante FACS se detectó la intensidad CFSE de los linfocitos T, mostrando proliferación de linfocitos T solo en presencia de B<sub>jab</sub> y TDB frente a CD20.

45 La FIGURA 56C es un conjunto de gráficos que muestran que TDB frente a CD20 es potente para destruir las 8 líneas de una manera dependiente de la dosis, con valores de CE50 de destrucción de linfocitos B (ng/ml) (arriba) y el porcentaje de destrucción de linfocitos B (abajo) representado como una función de la expresión de CD20 en el linfocito B diana.

50 La FIGURA 56D es un gráfico que muestra que los TDB que se dirigen a 5 antígenos de linfocitos B diferentes son comparables en la mediación de la destrucción de linfocitos T de células B<sub>jab</sub>. Se cultivaron linfocitos B en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 células B<sub>jab</sub> con 100.000 linfocitos T CD8<sup>+</sup> purificados de un donante sano con un TDB frente a CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9) o un TDB dirigido a un antígeno de linfocitos B diferente (es decir, TDB B-E, cada uno dirigido a un antígeno de linfocitos B diferente) a una concentración de 1000 ng/ml durante 24 horas.

55 La FIGURA 56E es un gráfico que muestra el grado de destrucción de linfocitos B para 10 líneas celulares de linfocitos B tumorales de leucemia/linfoma. Se cultivaron linfocitos B en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %. Para el ensayo de destrucción, se incubaron 20.000 linfocitos B con 100.000 linfocitos T CD8<sup>+</sup> purificados de un donante sano y 1000 ng/ml de TDB frente a CD20 (2H7v16/UCHT1v9) durante 24 horas.

60 La FIGURA 56F es un gráfico que muestra las curvas de destrucción en respuesta a la dosis para 8 donantes aleatorios.

65

La FIGURA 56G es un gráfico de curva resumido para CE50 (izquierda) y el grado de destrucción de linfocitos B (derecha) con 1000 ng/ml de anticuerpo en un ensayo de 24 horas para 30 donantes.

5 La FIGURA 56H es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de linfocitos B en 24 horas por TDB frente a CD20 es muy comparable o mayor que el de destrucción de linfocitos B por CD19 scFv. Para la destrucción de linfocitos B autólogos, se incubaron 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos durante 24 horas con TDB frente a CD20 a la concentración indicada. La destrucción celular informada se calculó como se describe a continuación.

10 La FIGURA 56I es un conjunto de gráficos que muestran que el grado de destrucción de linfocitos B en 24 horas por TDB frente a CD20 es comparable o mayor que el de destrucción de linfocitos B por CD19-TDB o CD22-TDB (panel superior) o CD79a o CD79b (panel inferior). Para la destrucción de linfocitos B autólogos, se incubaron 200.000 PBMC aisladas de un donante sano con 40.000 células B<sub>JAB</sub> durante 24 horas con TDB frente a CD20, CD19, CD22, CD79a o CD 79b a la concentración indicada. La destrucción celular informada se calculó como se describe a continuación.

20 La FIGURA 57A es una serie de gráficos que muestran los valores de expresión relativos para CD3 $\epsilon$  humanos detectados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y linfocitos T CD8<sup>+</sup> (panel central); y CD20 humano en linfocitos B CD19<sup>+</sup> (panel derecho) detectado en PBMC de ratón (mu) o humano (hu) medido por FACS. Las PBMC de ratón se derivaron de sangre de ratones doble transgénicos huCD3/huCD20; las PBMC humanas se derivaron de sangre de donantes sanos.

25 La FIGURA 57B es un gráfico que muestra que TDB frente a CD20 no puede activar linfocitos T murinas para disminuir los linfocitos B sin expresión de CD3 humano en ratones transgénicos CD20 humanos. Se trataron ratones transgénicos huCD20 o ratones doble transgénicos huCD20/CD3 una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB frente a CD20 y TDB frente a HER2). Se recogieron bazo de ratón en el día D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). El anticuerpo anti-CD20 humano rituximab se usa como control positivo. TDB frente a CD3/HER2 usado como control de isotipo negativo.

30 La FIGURA 57C es un gráfico que muestra que TDB frente a CD20 es capaz de acoplarse a linfocitos T murinas que expresan huCD3 en ratones doble transgénicos CD3/CD20 humanos para disminuir potentemente los linfocitos B murinas que expresan huCD20. Se trataron ratones transgénicos huCD20 o ratones doble transgénicos huCD20/CD3 una vez por vía intravenosa con anticuerpos como se indica (10 mg/kg para rituximab, 0,5 mg/kg para TDB frente a CD20 y TDB frente a HER2). Se recogieron bazo de ratón en el día D7 (7 días después del tratamiento con anticuerpos). TDB frente a CD3/HER2 usado como control de isotipo negativo.

40 La FIGURA 58A es una serie de gráficos de un estudio de evolución temporal que muestra que el tratamiento con TDB frente a CD20 dio como resultado una disminución sostenida de linfocitos B hasta el día D15 (15 días después de la dosificación). Se trataron ratones doble transgénicos huCD20/huCD3 una vez por vía intravenosa con diversas dosis de TDB frente a CD20. Se recogió sangre de ratón (D1, D8 y D15).

45 La FIGURA 58B es un gráfico que muestra que la disminución casi completa de los linfocitos B en el bazo de ratón solo se logró en D7 después de una dosis única de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg solo dio como resultado la disminución parcial de los linfocitos B del bazo. Se trataron ratones doble transgénicos huCD20/CD3 una vez por vía intravenosa con diversas dosis de TDB frente a CD20. Se recogieron los bazo (D7).

50 La FIGURA 58C es un gráfico que muestra que se observa una fuerte disminución de linfocitos B en D7 en la circulación de ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados con TDB frente a CD20. Se trataron ratones doble transgénicos huCD20/huCD3 una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20. La sangre se recogió en D0-5 min (5 minutos después del tratamiento), D0-2 h, D0-8 h, D1, D2, D3 y D7. Los linfocitos B que expresan huCD20 se midieron mediante FACS.

55 La FIGURA 58D es una serie de gráficos que muestran la activación de linfocitos T en ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados con un TDB frente a CD20. Los ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 tratados mostraron un incremento de hasta el 80 % en el recuento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan CD3 $\epsilon$  humanos 2 horas después del tratamiento con TDB frente a CD20, que volvió al nivel inicial en D2 y D7 (panel superior). De forma similar, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresan CD3 $\epsilon$  humanos incrementaron en un 80% 2 horas después del tratamiento con TDB frente a CD20 y posteriormente regresaron al nivel inicial en el día D2. Se trataron ratones doble transgénicos huCD3/huCD20 una vez por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20. La sangre se recogió en D0-5 min (5 minutos después del tratamiento), D0-2 h, D0-8 h, D1, D2, D3 y D7. Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresan CD3 $\epsilon$  fueron medidos por FACS.

65 La FIGURA 59A es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que TDB frente a CD20 disminuye los linfocitos B de la zona marginal (MZB) tan eficazmente como los linfocitos B foliculares (FOB) después de la administración de TDB a ratones doble transgénicos huCD3/huCD20. Se trataron dos animales doble transgénicos

(paneles izquierdo y derecho, respectivamente) con vehículo (paneles superiores) o una dosis intravenosa única de 0,5 mg/kg de TDB (paneles inferiores). Se recogieron bazo de ratón en D7 y se analizaron mediante FACS.

5 La FIGURA 59B-59E es una serie de gráficos que muestran que TDB frente a CD20 disminuye los linfocitos B de la zona marginal (MZB) (B) tan eficazmente como los linfocitos B foliculares (FOB) (C) después de una dosis intravenosa única de 0,5 mg/kg de TDB, junto con activación de linfocitos T CD8+ (D) y proliferación de linfocitos T CD8+ (E) en el bazo en los momentos indicados. Se recogieron bazo de ratón en D1, D2, D3, D5, D7 y D14.

10 La FIGURA 60A es un gráfico que muestra que los ratones NSG humanizados tratados con 3 dosis semanales de TDB frente a CD20 a 0,5 mg/kg (ajuste de dosis repetida) exhibieron niveles disminuidos de linfocitos B en sangre en D7, sin casi ninguna detección de linfocitos B en D21. Se trataron ratones NSG humanizados con 3 dosis de 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20 semanalmente por vía intravenosa. Se recogió sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. Los recuentos de linfocitos B murinos en sangre se midieron mediante FACS.

15 La FIGURA 60B es un gráfico que muestra que se observa una disminución robusta de linfocitos B en D21 en bazo de ratones NSG humanizados tratados con TDB frente a CD20. Se trataron ratones NSG humanizados con 3 dosis de 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20 semanalmente por vía intravenosa. Los bazo se recogieron en D21. Los recuentos de linfocitos B murinos en el bazo se midieron mediante FACS.

20 La FIGURA 60C es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran que los linfocitos T huCD8+ proliferan y los linfocitos B huCD19+ disminuyen 7 días después del tratamiento (D7) de ratones NSG humanizados con TDB frente a CD20. Se trataron ratones NSG humanizados con vehículo o 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20 (2H7v16/UHT1v9). Los bazo de ratones NSG humanizados tratados con CD20 y TDB de control se recogieron en D7. Los linfocitos B que expresan huCD19 y los linfocitos T que expresan huCD8 se midieron mediante FACS.

25 La FIGURA 60D es un gráfico que muestra que los ratones NSG humanizados tratados con 3 dosis semanales de TDB frente a CD20 a 0,5 mg/kg (ajuste de dosis repetida) exhibieron un incremento de hasta 10 veces en el recuento de linfocitos T CD8+ en D7, que volvió al nivel inicial o más bajo en D14 y D21. Se trataron ratones NSG humanizados con 3 dosis de 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20 semanalmente por vía intravenosa. Se recogió sangre en D-5 (5 días antes del tratamiento), D7, D14 y D21. El recuento de linfocitos T CD8+ murinos en sangre y la activación de los linfocitos T se midieron mediante FACS.

30 La FIGURA 60E es una serie de gráficos de citometría de flujo que muestran los niveles iniciales de linfocitos B huCD20+ (paneles centrales) y linfocitos T huCD8+ y huCD4+ (paneles derechos) de 2 ratones NSG humanizados medidos por FACS.

35 La FIGURA 60F es una serie de gráficos que muestran los niveles de expresión en la superficie celular de huCD3<sub>ε</sub> y expresión de CD20 en linfocitos B CD19+ (izquierda), linfocitos T CD8+ (centro) y linfocitos T CD4+ (derecha) detectadas por FACS.

40 La FIGURA 61A es un gráfico que muestra que TDB frente a CD20 es potente para destruir linfocitos B CLL con linfocitos T autólogos. Se incubaron 200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 48 horas en medio RPMI suplementado con FBS al 10 %. La FIGURA 61B es un gráfico que muestra que TDB frente a CD20 es potente para inducir la activación de linfocitos T autólogos en presencia de linfocitos B CLL. Se incubaron 200.000 PBMC con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 durante 48 horas en medio RPMI suplementado con FBS al 10 %.

45 La FIGURA 61C es un conjunto de gráficos que muestran que el recuento de linfocitos T es altamente correlativo con la destrucción de linfocitos B CLL *ex vivo*. Se incubaron 200.000 PBMC con 1000 ng/ml de TDB frente a CD20 durante 48 horas, ya sea solo o con linfocitos T CD8+ purificados de un donante sano. El porcentaje de linfocitos B CD19+ CD5+ y linfocitos T CD8+ en PBMC CLL es 90/0,55 para la muestra A1645, 76/3,5 para A1957, 87/0,63 para A1978, 69/1,3 para A1980. La destrucción celular, la inducción de granzima B y la activación de linfocitos T se midieron mediante FACS como se describe a continuación.

50 La FIGURA 62A es un conjunto de gráficos que muestran que la activación de linfocitos T (izquierda) después de dosis de 0,1 mg/kg o 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20 a ratones NSG con células leucémicas CLL injertadas se correlacionaba con la potente disminución de linfocitos B CLL injertados (derecha).

55 La FIGURA 62B es un conjunto de imágenes de inmunohistoquímica de secciones de bazo de ratones NSG con células leucémicas CLL injertadas, que muestran que pocos linfocitos B son detectables después del tratamiento con TDB frente a CD20. Se injertaron linfocitos B y T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB frente a HER2 y rituximab a 0,5 mg/kg, TDB frente a CD20 a 0,1 y 0,5 mg/kg, y se recogieron bazo para análisis por FACS 14 días después del tratamiento.

60 La FIGURA 63 es un gráfico que muestra el volumen tumoral ajustado a lo largo del tiempo de tumores injertados con Bjab de ratones SCID para el grupo 1 (vehículo: histidina/acetato 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, Tween

20 al 0,02 %); grupo 2 (TDB frente a CD20: 2H7v114/UCHT1.v9; 0,5 mg/kg); grupo 3 (vehículo: histidina/acetato 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, Tween 20 al 0,02 %, PBMC); y grupo 4 (TDB frente a CD20: CD20 2H7v114/CD3 UCHT1.v9; 0,5 mg/kg, PBMC). Las células efectoras eran PBMC derivadas de un donante humano sano. Los ratones fueron tratados una vez por semana durante dos semanas.

La FIGURA 64A es un gráfico que muestra el nivel relativo de expresión de CD20 en células B<sub>jab</sub>, NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19. Se inyectaron linfocitos B y T en ratones NSG como se describe a continuación. Los ratones se trataron una vez por vía intravenosa con TDB frente a HER2 y rituximab a 0,5 mg/kg, TDB frente a CD20 a 0,1 y 0,5 mg/kg, y se recogieron bazos para análisis IHC 14 días después del tratamiento.

La FIGURA 64B es un gráfico que muestra que rituximab y TDB frente a CD20 son comparables en su eficacia para destruir células B<sub>jab</sub> *in vitro*, que expresan un alto nivel de CD20 en su superficie celular. A las PBMC aisladas de donantes sanos se les quitaron los linfocitos B y se usaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular *in vitro*. Se incubaron 20.000 linfocitos B y 200.000 células efectoras con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 o rituximab durante 24 horas. Mediante FACS se detectó la expresión de TDB frente a CD20.

La FIGURA 64C es un gráfico que muestra que TDB frente a CD20, pero no rituximab, es capaz de destruir células NALM-6, SC-1 y OCI-LY 19, que tienen niveles relativamente bajos de CD20 en su superficie celular. A las PBMC aisladas de donantes sanos se les quitaron los linfocitos B y se usaron como células efectoras en el ensayo de destrucción celular *in vitro*. Se incubaron 20.000 linfocitos B y 200.000 células efectoras con diversas concentraciones de TDB frente a CD20 o rituximab durante 24 horas. Mediante FACS se detectó la expresión de TDB frente a CD20.

La FIGURA 64D es un gráfico que muestra los niveles de expresión en la superficie de los linfocitos B del antígeno CD20 desbloqueado como una función de la concentración de Rituximab-DANA medida por FACS. Se trataron ratones doble transgénicos CD20/CD3 con una dosis única de vehículo o Rituximab-DANA (10 mg/kg). Los bazos se recogieron 5 días después del tratamiento.

Las FIGURAS 65A y 65B son gráficos que muestran que TDB frente a CD20 es activo para destruir linfocitos B *in vitro* en presencia de niveles elevados de rituximab (A) o dexametasona (B). Primero se incubaron 200.000 PBMC aisladas de donantes sanos con rituximab-DANA a la concentración indicada durante 1 hora, luego se añadió TDB frente a CD20 y se incubó durante 24 horas. Para el ensayo de dexametasona, las células se trataron previamente con dexametasona 1  $\mu$ M durante la noche antes de añadir TDB frente a CD20. La destrucción celular se calculó como se describe a continuación.

La FIGURA 66 es un conjunto de gráficos que muestran que TDB frente a CD20 es activo en la disminución de linfocitos B en sangre (izquierda) y en el bazo (derecha) en ratones pretratados con rituximab-DANA. Para el tratamiento con un solo agente, se trataron ratones doble transgénicos huCD20/CD3 una vez por vía intravenosa a la dosis indicada; para el tratamiento combinado, los ratones fueron tratados primero por vía intravenosa con rituximab-DANA y se les inyectó TDB frente a CD20 por vía intravenosa 30 minutos después. Se recogió sangre en D-7, D0-2h (2 horas después del tratamiento con TDB) y D7; los bazos se recogieron en D7. Los recuentos de linfocitos B se midieron mediante FACS como se describe a continuación.

La FIGURA 67A es un conjunto de gráficos que muestran el recuento de linfocitos B (izquierda), linfocitos T CD4+ (centro) y linfocitos T CD8+ (derecha) en muestras de sangre de 3 macacos cangrejeros antes y 7 días después del tratamiento con una única dosis intravenosa de 1 mg/kg TDB frente a CD20. Tres macacos cangrejeros fueron tratados una vez por vía intravenosa con 1 mg/kg de TDB frente a CD20. Se recogió sangre en D-7 (7 días antes de la dosificación), D0-4 h (4 horas inmediatamente después de la dosificación) y D7.

La FIGURA 67B es un conjunto de gráficos que muestran los niveles de linfocitos B, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en el bazo (izquierda), ganglios linfáticos mandibulares (centro) y ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 macacos cangrejeros 7 días después del tratamiento con una dosis intravenosa única de 1 mg/kg de TDB frente a CD20. Tres macacos cangrejeros fueron tratados una vez por vía intravenosa con 1 mg/kg de TDB frente a CD20. Se recogió sangre en D-7 (7 días antes de la dosificación), D0-4 h (4 horas inmediatamente después de la dosificación) y D7.

La FIGURA 67C es un conjunto de gráficos que muestran los niveles de linfocitos B, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en el bazo (izquierda), ganglios linfáticos mandibulares (centro) y ganglios linfáticos mesentéricos (derecha) de 3 macacos cangrejeros antes del tratamiento con una dosis única intravenosa de 1 mg/kg de TDB frente a CD20. Tres macacos cangrejeros fueron tratados una vez por vía intravenosa con 1 mg/kg de TDB frente a CD20. Se recogió sangre en D-7 (7 días antes de la dosificación), D0-4 h (4 horas inmediatamente después de la dosificación) y D7.

La FIGURA 67D es un conjunto de gráficos que muestran los niveles iniciales de linfocitos B y linfocitos T CD4+ y CD8+ como porcentaje del total de linfocitos detectados en el bazo (izquierda) y los ganglios linfáticos mandibulares (derecha) en animales tratados con control de vehículo.

- 5 La FIGURA 68A es un conjunto de gráficos que muestran la concentración sérica de TDB frente a CD20 de sangre recogida y muestras de suero de cuatro macacos cangrejeros que fueron tratados 4 veces por semana con 1 mg/kg de TDB frente a CD20 mediante administración intravenosa.
- 10 La FIGURA 68B es un conjunto de gráficos que muestran la concentración de TDB frente a CD20 de muestras de suero recogidas de animales descritos en las figuras 65 y 66A. Se representaron gráficamente la media  $\pm$  de.
- 15 La FIGURA 69A es un histograma que muestra la expresión de PD-L1 en células A20-huCD20 de ratones Balb/C singénicos A20-huCD20, evaluado mediante citometría de flujo.
- 20 La FIGURA 69B es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo); grupo 2 (TDB frente a CD20 a 0,5 mg/kg); grupo 3 (anticuerpo anti-PD-L1 a 10 mg/kg); y grupo 4 (TDB frente a CD20 a 0,5 mg/kg + anticuerpo anti-PD-L1).
- 25 La FIGURA 70 es un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TDB frente a FcRH5 sometidas a prueba para la unión *in vitro* a linfocitos T CD8+ que expresan CD3.
- 30 La FIGURA 71A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB frente a FcRH5, con linfocitos T CD8+ purificados a partir de PBMC humanas del n.º 1.
- 35 La FIGURA 71B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana MOLP-2 como una función de la concentración de TDB frente a FcRH5, con linfocitos T CD8+ purificados a partir de PBMC humanas del Donante n.º 2.
- 40 La FIGURA 72A es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ como una función de la concentración de TDB frente a FcRH5, evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron MOLP-2 y los linfocitos T CD8+ se purificaron del donante n.º 1.
- 45 La FIGURA 72B es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD107a+ como una función de la concentración de TDB frente a FcRH5, evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron MOLP-2 y los linfocitos T CD8+ se purificaron del donante n.º 1.
- 50 La FIGURA 72C es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ como una función de la concentración de TDB frente a FcRH5, evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron MOLP-2 y los linfocitos T CD8+ se purificaron del donante n.º 2.
- 55 La FIGURA 72D es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD107a+ como una función de la concentración de TDB frente a FcRH5, evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron MOLP-2 y los linfocitos T CD8+ se purificaron del donante n.º 2.
- 60 La FIGURA 73 es un conjunto de gráficos que muestran las curvas de unión para cada una de las tres TDB frente a HER2 analizadas para unión *in vitro* a células SKBR3 que expresan Her2 (arriba) y linfocitos T CD8+ que expresan CD3 (abajo).
- 65 La FIGURA 74A es un gráfico que muestra las curvas de unión de trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífico) para unión *in vitro* a células SKBR3 que expresan Her2.
- La FIGURA 74B es un gráfico que muestra el porcentaje de células SKBR3 viables como una función de la concentración de trastuzumab (bivalente), trastuzumab (Fab) y TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (biespecífica), evaluado por CELLTITERGLO® Ensayo de viabilidad de células luminiscentes.
- La FIGURA 74C es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucciones de células diana SKBR3 mediadas por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de trastuzumab (T-mab), trastuzumab producido en *E. coli* (T-mab *E. coli*) y TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células lisadas.
- La FIGURA 75 es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana de SKBR3 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB).
- La FIGURA 76A es una serie de paneles. El panel superior es una representación de la estructura cristalina del dominio extracelular (ECD) de HER2 unido por hu4D5 Fab (Trastuzumab), 2C4 Fab (Pertuzumab) y 7C2. El panel inferior es una estructura de cinta del CD3ε unida por 2C11, 38E4v1 y 40G5c.
- La FIGURA 76B es una tabla que indica las afinidades de unión, representadas por la constante de disociación  $K_D$

(nM), de TDB frente a HER2 para tres brazos de HER2 diferentes: hu4D5, 2C4 y 7C2. El panel inferior derecho es una tabla que indica las afinidades de unión, representadas por la constante de disociación  $K_D$  (nM), de TDB frente a HER2 para tres brazos diferentes CD3  $\epsilon$ : 38E4v1, 40G5c y 2C11.

5 La FIGURA 76C es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana MCF7 que expresan HER2 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (hu4D5-TDB, 2C4-TDB y 7C2-TDB). La citotoxicidad se midió mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

10 La FIGURA 77 es un gráfico que muestra que los brazos frente a HER2 hu4D5 y 2C4 son potentes mediadores de la destrucción celular como se muestra por el porcentaje máximo de destrucción de células diana SKBR3 logrado mediante el tratamiento con las siguientes variantes de TDB frente a HER2: hu4D5-38E4v1, hu4D5-40G5c, 2C4-38E4v1, 2C4-40G5c, 7C2-38E4v1 y 7C2-40G5c.

15 La FIGURA 78 es una serie de gráficos que muestran la potencia de variantes de TDB frente a HER2 para destruir líneas celulares SKBR3 que expresan HER2 (izquierda) y MCF7 que expresan HER2 (derecha) de una manera dependiente de la dosis, con valores de CE50 de destrucción de células diana (pM).

20 La FIGURA 79 es una serie de gráficos que muestran el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 que expresan HER2 para varios TDB con brazos de HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) emparejados con brazos frente a CD3 de alta afinidad (38E4v1) o baja afinidad (40G5c) como función de concentración de TDB (ng/ml).

25 La FIGURA 80 es una serie de paneles. El panel de la izquierda muestra la potencia de las variantes de TDB frente a HER2 (hu4D5-38E4v1, 2C4-38E4v1, 7C2-38E4v1; hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c, 7C2-40G5c) para destruir líneas celulares SKBR3 que expresa HER2 y MCF7 que expresa HER2 de manera dependiente de la dosis, con valores de CE50 de destrucción de células diana (pM). El panel de la derecha es una tabla con la proporción de CE50 de las variantes de TDB frente a HER2 dadas en células objetivo MCF7 frente a SKBR3 para tres experimentos.

30 La FIGURA 81 es una serie de paneles. El panel superior muestra una tabla que enumera las variantes del brazo hu4D5 HER2 (hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10, hu4D5v31, hu4D5.Y100A) para TDB frente a HER2 (brazo 40G5c CD3) y la CE50 correspondiente (ng/ml) para la destrucción de célula diana SKBR3, afinidad de unión a HER2 ( $K_D$ , nM) además de la proporción de la afinidad de unión de HER2  $K_D$  y CE50 de destrucción de células diana SKBR3 para las variantes de hu4D5 en relación con hu4D5. El panel inferior es un gráfico que muestra la correlación entre la proporción de CE50 de SKBR3 para las variantes hu4D5 TDB frente a HER2 (hu4D5, hu4D5v7, hu4D5v5, hu4D5v10 y hu4D5v31) y la proporción  $K_D$  relativa para las variantes hu4D5 TDB frente a HER2.

35 La FIGURA 82 es una serie de gráficos que muestran el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 y MCF7 como una función de la concentración de las siguientes variantes de TDB frente a HER2: hu4D5-40G5c (superior izquierda), hu4D5v7-40G5c (superior centro), hu4D5v5-40G5c (superior derecha), hu4D5v10-40G5c (inferior izquierda), hu4D5v31-40G5c (inferior centro), hu4D5.Y100A-40G5c (inferior derecha).

40 La FIGURA 83 es una serie de gráficos. El gráfico de la izquierda muestra el porcentaje de destrucción de células diana como una función de la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) de anticuerpos monoespecíficos bivalentes bloqueadores de HER2 específicos para el brazo frente a HER2 designado de TDB frente a HER2. (Anticuerpos bloqueadores de HER2: anticuerpos monoespecíficos bivalentes contra hu4D5, 2C4 y 7C2. TDB frente a HER2: hu4D5-40G5c, 2C4-40G5c y 7C2-38E4v1 en concentración fija: 10 ng/ml.) El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de células viables como una función de la concentración del anticuerpo HER2 (hu4D5) trastuzumab en presencia y ausencia de TDB frente a HER2 hu4D5-40G5c.

45 La FIGURA 84 es una serie de paneles. El panel superior es una tabla que proporciona la reactividad de las variantes del brazo frente a HER2 con HER2 como se mide mediante diversos ensayos de unión, además de la reactividad de los clones de HER2 con el anticuerpo hu4D5 trastuzumab. El panel inferior es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana como una función de la concentración (pM) de Fab biespecífico de HER2 para los clones dados (hu4D5, 3H4 y 2H11). Los valores de CE50 se dan para cada clon en pM.

50 La FIGURA 85 es una tabla que proporciona información de afinidad y reactividad para las variantes del brazo frente a CD3 de TDB frente a HER2 (38E4v1, 38E4, SP34, 40G5c y 2C11).

55 La FIGURA 86 es un gráfico que muestra la destrucción de células diana CT26 que expresan HER2 como una función de la concentración (ng/ml) de variantes de TDB frente a HER2 (hu4D5-2C11, hu4D5-SP34, 7C2-2C11 y 2C4-2C11). Células efectoras Linfocitos T derivados de CD3-TG

60 La FIGURA 87A es un gráfico que muestra el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) medido a lo largo del tiempo (0-5 días) en animales tratados con vehículo o TDB frente a HER2 (0,5 mg/kg).

65 La FIGURA 87B es una serie de gráficos. El gráfico superior izquierdo muestra el porcentaje de células CD45+ periféricas por cada 5 células detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB frente a HER2

- 5 (0,5 mg/kg). El gráfico superior derecho muestra el porcentaje de células CD45+ periféricas que son células CD8+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB frente a HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior izquierdo muestra el porcentaje de células CD45+ periféricas que son CD4+ detectadas el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB frente a HER2 (0,5 mg/kg). El gráfico inferior derecho muestra el porcentaje de células CD8+ periféricas que se detectan con IFN+ el día 6 después del tratamiento con vehículo o TDB frente a HER2 (0,5 mg/kg).
- 10 La FIGURA 88A es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra un diagrama en cascada del cambio porcentual en el volumen tumoral en animales tratados con vehículo o variante de TDB frente a HER2 (hu4D5-SP34 o hu4D5-2C11; 0,5 mg/kg; i.v., semanalmente, 5 semanas). El gráfico inferior muestra un diagrama en cascada del cambio porcentual en el volumen tumoral en animales tratados con la variante TDB frente a HER2 (2C4-38E4; 0,5 mg/kg; i.v., semanalmente, 5 semanas).
- 15 La FIGURA 88B es una serie de gráficos. El gráfico superior muestra el volumen tumoral como porcentaje del volumen inicial como una función del tiempo (días) para los animales tratados con vehículo o TDB frente a HER2 (hu4D5-SP34). El gráfico inferior muestra el volumen tumoral como porcentaje del volumen inicial como una función del tiempo (días) para animales tratados con vehículo o TDB frente a HER2 (hu4D5-2C11). (TDB frente a HER2) 0,5 mg/kg; i.v., semanal, 5 semanas).
- 20 La FIGURA 89 es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD107a+ como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (hu4D5-TDB, hu4D5.91A-TDB y hu4D5.Y100A-TDB)hu4D5, evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron células SKBR3; las células efectoras fueron linfocitos T CD8+; proporción célula efectora:célula diana = 3:1.
- 25 La FIGURA 90A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5 y SP34/hu4D5).
- 30 La FIGURA 90B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).
- 35 La FIGURA 90C es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).
- La FIGURA 91A es un gráfico que muestra la curva de unión para cada uno de los tres TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5) analizados para unión *in vitro* a linfocitos T que expresan CD8+ CD3 evaluado mediante análisis por FACS.
- 40 La FIGURA 91B es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5, 38E4c/hu4D5 y 40G5c/hu4D5).
- 45 La FIGURA 92A es un gráfico que muestra la curva de unión para los dos TDB frente a HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) analizados para unión *in vitro* a linfocitos T que expresan CD8+ CD3, evaluado mediante análisis por FACS.
- 50 La FIGURA 92B es un gráfico que muestra la curva de unión para los dos TDB frente a HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) analizados para unión *in vitro* a células SKBR3 que expresan Her2, evaluado mediante análisis por FACS.
- 55 La FIGURA 92C es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5) evaluado mediante análisis por FACS. Las células efectoras eran linfocitos T CD8+ humanas; proporción célula efectora:célula diana = 3:1.
- 60 La FIGURA 92D es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (38E4c/hu4D5 y 38E4/hu4D5).
- 65 La FIGURA 93A es un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ granzimaB+ como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron células SKBR3; las células efectoras fueron linfocitos T CD8+; proporción célula efectora:célula diana = 3:1.
- La FIGURA 93B es una serie de gráficos que muestran la exocitosis granular de células diana mediada por linfocitos T TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) detectada mediante ELISA para perforina y granzimas A y B, y el porcentaje de destrucción de células diana evaluado mediante la liberación de LDH. Las células diana fueron células SKBR3; las células efectoras fueron PBMC; proporción célula efectora:célula diana = 30:1.
- La FIGURA 93C es una serie de gráficos que muestran la apoptosis de células diana mediada por linfocitos T TDB

frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) medida por las actividades de caspasa-3 y caspasa-7 en un ensayo CASPASE-GLO® 3/7, apoptosis en un ensayo ELISA<sup>plus</sup> de detección de destrucción celular y liberación de LDH. Las células diana fueron células SKBR3; las células efectoras fueron PBMC; proporción célula efectora:célula diana = 10:1.

5 La FIGURA 93D es la imagen de una inmunoelectrotransferencia (arriba) que muestra la expresión de Her2 en células transfectadas 3T3 y un gráfico (abajo) que muestra el porcentaje de destrucción de células diana por linfocitos T activados como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), medido por la liberación de LDH. Las células diana fueron 3T3-Vector y 3T3-HER2; las células efectoras fueron PBMC; proporción célula efectora: célula diana = 10:1.

10 La FIGURA 93E es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana BT474 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en presencia de trastuzumab Fab (T-Fab) o dominio extracelular (ECD) de HER2 soluble, evaluado mediante la liberación de LDH. Las células efectoras fueron linfocitos T CD8+; proporción célula efectora:célula diana = 5:1.

15 La FIGURA 93F es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) después de la disminución de las células CD3+ de la población de células efectoras PBMC. Proporción célula efectora:célula diana = 20:1.

20 La FIGURA 94A es una serie de gráficos que muestran el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ (izquierda) y linfocitos T CD8+ CD107a+ (centro) como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante análisis por FACS, y el porcentaje de destrucción de células diana SKBR3 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (derecha). Las células diana fueron células SKBR3; las células efectoras fueron linfocitos T CD8+; proporción célula efectora:célula diana = 3:1.

25 La FIGURA 94B es una serie de gráficos que muestran el porcentaje de destrucción de células diana BT474 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) (izquierda) y el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ granzimaB+ como una función de concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5)(derecha), evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron células BT474; las células efectoras fueron linfocitos T CD8+; proporción célula efectora:célula diana como se indica.

30 La FIGURA 95A es una serie de histogramas que muestran la expresión de CFSE en linfocitos T CD8+ en presencia de células diana SKBR3 y/o TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5).

35 La FIGURA 95B es un gráfico que muestra el cambio en veces en el número de células CD8+ como una función del tiempo después de la incubación con células diana SKBR3 y TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante análisis por FACS.

40 La FIGURA 95C es una serie de gráficos que muestran el cambio en veces en el número de células CD8+ como una función del tiempo después de la incubación con células diana SKBR3, TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) y 20 ng/ml de IL-2, evaluado mediante análisis por FACS.

45 La FIGURA 96A es una imagen de una inmunoelectrotransferencia que muestra el nivel de expresión de Her2 en un panel de líneas celulares tumorales humanas.

La FIGURA 96B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante la liberación de LDH. Las células diana fueron BJBAB, MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, SKBR3 y BT474; las células efectoras fueron PBMC; proporción célula efectora: célula diana = 25:1.

50 La FIGURA 96C es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron MCF7 y SKBR3; las células efectoras fueron PBMC; proporción célula efectora:célula diana = 20:1.

55 La FIGURA 96D es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron BJBAB y SKBR3; las células efectoras fueron PBMC; proporción célula efectora:célula diana = 20:1.

60 La FIGURA 96E es una tabla que muestra el número de copias de HER2 para un panel de células diana y para cada una, la CE50 de TDB frente a HER2 y el porcentaje de ocupación de HER2 a esa concentración. Las células diana son MDA435, MDA231, MCF7, MDA453, BT474 y SKBR3.

65 La FIGURA 97A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante la liberación de LDH. Las células diana fueron SKBR3, HCC1569, KPL4, HCC202, JIMT1 y CALU3; las células efectoras fueron PBMC; proporción célula efectora:célula diana = 10:1.

- 5 La FIGURA 97B es un gráfico que muestra el porcentaje de células diana viables como una función de la concentración de trastuzumab emtansina (T-DM1) evaluado por CELLTITERGLO® ensayo de viabilidad de células luminiscentes. Las células diana fueron BT474-M1 original y BT474-M1 resistente a T-DM1; las células efectoras fueron linfocitos T CD8+; proporción célula efectora:célula diana = 3:1.
- 10 La FIGURA 97C es un gráfico que muestra el porcentaje de células diana viables como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron BT474-M1 original y BT474-M1 resistente a T-DM1; las células efectoras fueron linfocitos T CD8+; proporción célula efectora:célula diana = 3:1.
- 15 La FIGURA 98 es un gráfico y una tabla que muestra la farmacocinética (FC) de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) en ratas Sprague-Dawley evaluado mediante ELISA.
- 20 LA FIGURA 99A es un gráfico que muestra el volumen relativo tumoral a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); grupo 2 (PBMC(1) + vehículo a 0,5 mg/kg); grupo 3 (PBMC(1) + TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg); grupo 4 (PBMC(2) + vehículo a 0,5 mg/kg); y grupo 5 (PBMC(2) + TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).
- 25 LA FIGURA 99B es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); y grupo 2 (TDB frente a HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).
- 30 LA FIGURA 99C es un histograma que muestra el porcentaje relativo de cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); y grupo 2 (TDB frente a HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg).
- 35 LA FIGURA 99D es un gráfico que muestra el volumen relativo tumoral a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); y grupo 2 (TDB frente a HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg). Los casos con respuesta incluyeron tumores de más de 1000 mm<sup>3</sup> al inicio del tratamiento.
- 40 La FIGURA 99E es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo para el grupo 1 (control brazo frente a CD3 TDB frente a HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg); y grupo 2 (control TDB (2C11) a 0,5 mg/kg).
- 45 LA FIGURA 99F es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); y grupo 2 (TDB frente a HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).
- 50 LA FIGURA 99G es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); grupo 2 (TDB frente a HER2 (hu4D5/2C11) a 0,5 mg/kg); grupo 3 (control TDB (2C11) a 0,5 mg/kg); y grupo 4 (T-DM1 a 15 mg/kg).
- 55 La FIGURA 100A es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo para el grupo 1 (Sin tratar); grupo 2 (TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) a 0,5 mg/kg).
- 60 La FIGURA 100B es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); grupo 2 (PBMC(3) + vehículo a 0,5 mg/kg); y grupo 3 (PBMC(3) + control TDB (2C11) a 0,5 mg/kg).
- 65 La FIGURA 101A es un gráfico que muestra la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-UCHT1 analizado para unión *in vitro* a CD3 humano en linfocitos T humanos, linfocitos T CD3 TG y linfocitos T BALB/c, evaluado mediante análisis por FACS.
- La FIGURA 101B es un gráfico que muestra la afinidad de unión para el anticuerpo CD3-2C11 analizado para unión *in vitro* a CD3 de ratón en linfocitos T CD3 TG y linfocitos T BALB/c, evaluado mediante análisis por FACS.
- La FIGURA 102A es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana CT26-HER2 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5), evaluado mediante análisis por FACS. Las células efectoras fueron linfocitos T aislados de sangre periférica humana, linfocitos T esplénicos transgénicos huCD3 y linfocitos T esplénicos BALB/c.
- La FIGURA 102B es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana CT26-HER2 como una función de la concentración de TDB frente a HER2 (hu4D5/2C11), evaluado mediante análisis por FACS. Las células efectoras fueron linfocitos T aislados de sangre periférica humana, linfocitos T esplénicos transgénicos huCD3 y linfocitos T esplénicos BALB/c.
- La FIGURA 103 es un gráfico que muestra el volumen tumoral relativo a lo largo del tiempo para el grupo 1 (vehículo a 0,5 mg/kg); y grupo 2 (TDB frente a HER2 (hu4D5/SP34) a 0,5 mg/kg).

La FIGURA 104 un gráfico que muestra las curvas de unión para cada una de las tres TDB frente a LYPD1 analizadas para unión *in vitro* a linfocitos T CD8+ que expresan CD3.

- 5 La FIGURA 105 es un gráfico que muestra el porcentaje de destrucción de células diana de OVCAR3.Luc como una función de la concentración de TDB frente a LYPD1.

La FIGURA 106 es un conjunto de gráficos que muestran el porcentaje de linfocitos T CD8+ CD69+ (izquierda) y CD8+ CD25+ (derecha) como una función de la concentración de TDB frente a LYPD1, evaluado mediante análisis por FACS. Las células diana fueron células OVCAR3.Luc; proporción célula efectora:célula diana = 3:1.

10

La FIGURA 107 muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (arriba) y del dominio variable de la cadena pesada (abajo) del anticuerpo anti-RET 41205.v6.

- 15 La FIGURA 108A es un gráfico que muestra el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) como una función del tiempo (días) para el grupo 1 (vehículo, qwx3, i.v.; n=9); grupo 2 (TDB frente a CD20 (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v.; n=9); grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, i.p.; n=9); y grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, IP+ TDB frente a CD20 (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v.; n=9).

20 La FIGURA 108B es un gráfico que muestra el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) como una función del tiempo (días) para el grupo 1 (vehículo, qwx3, i.v.; n=9); grupo 2 (TDB frente a CD20 (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v.; n=9); grupo 3 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, i.p.; n=9); y grupo 4 (anti-PD1 (mu8F11 DANA), 10 mg/kg, tiwx3, i.p. + TDB frente a CD20 (2H7-mu2C11), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v.; n=9). La línea continua en negrita representa el volumen tumoral ajustado para el grupo especificado.

25

## Descripción detallada de modos de realización de la invención

### I. Definiciones

- 30 El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido para el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que se dirigen a ese valor o parámetro por se.

35 Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

45

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación ( $K_d$ ). La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

55

Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

- 60 Las expresiones "anticuerpo anti-CD3" y "un anticuerpo que se une a CD3" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a CD3 con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a CD3. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD3 a una proteína distinta de CD3 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a CD3 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a CD3 tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo,

65

de  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  M). En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-CD3 se une a un epítipo de CD3 que se conserva entre CD3 de especies diferentes.

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

10 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

15 Por "dominio de unión" se quiere decir una parte de un compuesto o una molécula que se une específicamente a un epítipo, antígeno, ligando o receptor diana. Los dominios de unión incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, policlonales, recombinantes, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpo o porciones de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab'<sub>2</sub>, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio, diacuerpos, minicuerpos, scFv-Fc, aficuerpos, nanocuerpos y dominios VH y/o VL de anticuerpos),  
20 receptores, ligandos, aptámeros y otras moléculas que tienen un compañero de unión identificado.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenetesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enodinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omegall (véase, por ejemplo, Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4; dinamicina, incluyendo dinamicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodinos de cromoproteínas relacionados), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de doxorrubicina HCl (DOXIL®), doxorrubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorrubicina liposomal pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamycina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); combretastatina; análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® complejo de polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo la vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®,

FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como el ácido retinoico, incluyendo el bexaroteno (TARGRETIN®); bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de citosina nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (por ejemplo, erlotinib (Tarčeva™)); y VEGF-A que reducen la proliferación celular; vacunas tales como THERATOPE® vacunas y vacunas de terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN® vacuna, LEUVECTINA® vacuna y VAXID® vacuna; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tales como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR; inhibidores de tirosina cinasa; inhibidores de la serina-treonina cinasa tales como la rapamicina (sirólimus, RAPAMUNE®); inhibidores de la farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura de un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura de una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y ácido folínico, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterápicos como se define en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "tratamientos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismas, incluyendo, pero sin limitarse a: antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestania, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprorelina y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribocimas, tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribocima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, tales como vacunas de tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; vinorelbina y esperamicinas (véase la pat. de EE. UU. n.º 4.675.187) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

El término "grupo de diferenciación 3" o "CD3", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CD3 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo, incluyendo, por ejemplo, las cadenas CD3ε, CD3γ, CD3α y CD3β. El término engloba el CD3 no procesado "de longitud completa" (por ejemplo, CD3ε o CD3γ no procesado o no modificado), así como cualquier forma de CD3 que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de CD3, incluyendo, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. CD3 incluye, por ejemplo, la proteína CD3ε humana (RefSeq n.º NP\_000724 de NCBI), que tiene 207 aminoácidos de longitud, y la proteína CD3γ humana (RefSeq n.º NP\_000064 de NCBI), que tiene 182 aminoácidos de longitud.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca

(vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de micromoléculas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anómala. En un modo de realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer. En un modo de realización, el trastorno proliferativo celular es un tumor.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfáticas. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma pulmonar de células escamosas, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer estromal gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, melanoma, melanoma de extensión superficial, lentigo maligno melanoma, melanomas lentiginosos acros, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no hodgkiniano (LNH) folicular/de grado bajo; LNH linfocítico pequeño (LP); LNH folicular/de grado intermedio; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de grado alto; LNH linfoblástico de grado alto; LNH de células pequeñas no escindidas de grado alto; LNH voluminoso; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPT), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer cerebral, así como de cabeza y cuello, y metástasis asociadas. En determinados modos de realización, los cánceres susceptibles de tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, carcinoma de pulmón no microcítico, glioblastoma, linfoma no hodgkiniano (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. En algunos modos de realización, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón microcítico, glioblastoma, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR) y carcinoma hepatocelular. Aún, en algunos modos de realización, el cáncer se selecciona de: carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, glioblastoma y carcinoma de mama, incluyendo las formas metastásicas de esos cánceres. En otros modos de realización, el cáncer se selecciona de una clase de cánceres de linfocitos B maduras que excluyen el linfoma hodgkiniano pero que incluyen DLBCL similar a linfocitos B (GCB) de centro germinal, DLBCL similar a linfocitos B activadas (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), central linfoma del sistema nervioso (CNSL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células pilosas, linfoma/leucemia esplénica, inclasificable, linfoma esplénico de linfocitos B pequeños de pulpa roja difusa, variante de leucemia de células pilosas, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de las cadenas pesadas,  $\alpha$  enfermedad de las cadenas pesadas, y enfermedad de las cadenas pesadas,  $\mu$  enfermedad de las cadenas pesadas, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma solitario de hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma extraganglionar de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT), ganglionar linfoma de la zona marginal, linfoma de la zona marginal ganglionar pediátrico, linfoma folicular pediátrico, linfoma cutáneo primario del centro del folículo, linfoma de linfocitos B grandes rico en linfocitos T/histiocitos, DLBCL primario del SNC, DLBCL cutáneo primario, tipo de pierna, DLBCL positivo para EBV de ancianos, DLBCL asociado con inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes positivo para ALK, linfoma plasmablastico, linfoma de linfocitos B grandes que surge en HHV8 -enfermedad de Castleman multicéntrica asociada, linfoma de derrame primario: Linfoma de linfocitos B, inclasificable, con rasgos característicos intermedios entre el linfoma difuso de linfocitos B grandes y el linfoma de Burkitt, y linfoma de linfocitos B, inclasificable, con rasgos característicos intermedios entre el linfoma difuso de linfocitos B grandes y el linfoma hodgkiniano clásico.

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos

"cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

5 El término "antígeno tumoral", tal como se usa en el presente documento, se puede entender como aquellos antígenos que se presentan en las células tumorales. Estos antígenos se pueden presentar en la superficie celular con una parte extracelular, que a menudo se combina con una parte transmembrana y citoplasmática de la molécula. Estos antígenos en ocasiones pueden ser presentados únicamente por las células tumorales y nunca por las normales. Los antígenos tumorales se pueden expresar exclusivamente en células tumorales o pueden representar una mutación específica del tumor en comparación con las células normales. En este caso, se denominan antígenos específicos de tumores. Más comunes son los antígenos tumorales que presentan las células tumorales y las células normales, y se denominan antígenos asociados a tumores. Estos antígenos asociados a tumores se pueden sobreexpresar en comparación con las células normales o son accesibles para la unión de anticuerpos en células tumorales debido a la estructura menos compacta del tejido tumoral en comparación con el tejido normal. En un aspecto, el antígeno tumoral se selecciona entre los establecidos en la Tabla 1 a continuación.

15 Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

25 Una "cantidad eficaz" de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 de la invención o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) del mismo, es al menos la cantidad mínima requerida para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, tal como una mejora medible o prevención de un trastorno particular (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer). Una cantidad eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento se compensa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para su uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para su uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como disminuir uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, incrementar la calidad de vida de los que padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otro medicamento tal como por medio de selección, retrasar la progresión de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede tener el efecto de reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida o deseablemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y deseablemente detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones. Para los propósitos de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir un tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede lograr o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una "cantidad eficaz" se puede considerar en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y un único agente se puede considerar que se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

50 El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

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

65 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente

similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* o bien *in vivo*. En un modo de realización, el agente inhibidor del crecimiento es un anticuerpo inhibidor del crecimiento que evita o reduce la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. En otro modo de realización, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Los bloqueantes de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Determinados agentes que detienen G1 también abarcan la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

Un cáncer "positivo para HER2" comprende células cancerosas que tienen niveles mayores de lo normal de HER2. Los ejemplos de cáncer positivo para HER2 incluyen cáncer de mama positivo para HER2 y cáncer gástrico positivo para HER2. Opcionalmente, el cáncer positivo para HER2 tiene una puntuación inmunohistoquímica (IHQ) de 2+ o 3+ y/o una proporción de amplificación por hibridación *in situ* (ISH)  $\geq 2,0$ .

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada principal y la descendencia derivada de la misma, independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos de aminoácido que aparecen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un

anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contacto con el antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR ejemplares en el presente documento incluyen:

1. a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));
2. b) CDR que se producen en los residuos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));
3. c) contactos con antígeno que se producen en los residuos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); y
4. d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen los residuos de aminoácido de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico.

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o un 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para la valoración de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

Un "ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD3" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no se conjuga con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 dáltones, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se enlazan con disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, del extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

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

El término "antagonista de unión al eje PD-1" es una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión al eje PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, para eliminar la disfunción de los linfocitos T resultante de la señalización en el eje de señalización de PD-1, siendo un resultado el restablecimiento o potenciación de la función de los linfocitos T (por ejemplo, proliferación, producción de citocinas, destrucción de células diana). Como se usa en el presente documento, un antagonista de unión al eje PD-1 incluye un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 y un antagonista de unión a PD-L2.

El término "antagonistas de unión a PD-1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-L1, PD-L2. En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2. En un modo de realización, un antagonista de unión a PD-1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1, de modo que hace que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunos modos de realización, el antagonista de unión a PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es MDX-1106 (nivolumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión a PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es CT-011 (pidilizumab), descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un antagonista de unión a PD-1 es AMP-224 descrito en el presente documento.

El término "antagonista de unión a PD-L1" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o bien más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos modos de realización, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1. En un modo de realización, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 para hacer que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras con respecto al reconocimiento antigénico). En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70, descrito en el presente documento. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A descrito en el presente documento. Todavía en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 descrito en el presente documento.

El término "antagonista de unión a PD-L2" se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o bien más de sus compañeros de unión, tales como PD-1. En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunos modos de realización, los

antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, anulan o interfieren en la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tal como PD-1. En un modo de realización, un antagonista de unión a PD-L2 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por o a través de proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2, de modo que hace que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, potenciando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En algunos modos de realización, un antagonista de unión a PD-L2 es una inmunoadhesina.

El término "proteína", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término engloba proteína sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

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

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

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

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se le administraría la formulación.

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

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante el trascurso de análisis clínicos. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, evitar la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del grado de actividad de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos modos de realización se usan los anticuerpos de la

invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, "retrasar la progresión" de un trastorno o enfermedad significa aplazar, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer). Este retraso puede tener duraciones de tiempo variables dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo al que se está tratando. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede englobar, en efecto, la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, se puede retrasar un cáncer en fase tardía, tal como el desarrollo de metástasis.

Por "reducir" o "inhibir" se quiere decir la capacidad de provocar una disminución global, por ejemplo, de un 20 % o mayor, de un 50 % o mayor, o de un 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor. En determinados modos de realización, reducir o inhibir puede hacer referencia a la función efectora de un anticuerpo que está mediada por la región Fc de anticuerpo, incluyendo específicamente dichas funciones efectoras la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se une. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Como se usa en el presente documento, "administrar" quiere decir un procedimiento de administración de una dosificación de un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 de la invención, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD3 de la invención) o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-CD3 de la invención) a un sujeto. Las composiciones utilizadas en los procedimientos descritos en el presente documento se pueden administrar, por ejemplo, por vía intramuscular, intravenosa, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada con baño de células diana directo, por catéter, por lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. El procedimiento de administración puede variar dependiendo de diversos factores (por ejemplo, el compuesto o composición que se administra y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se trata).

## II. Composiciones y procedimientos

Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para tratar o retrasar la progresión de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer) o un trastorno autoinmunitario, o para potenciar la función inmunitaria en un sujeto que padece dicho trastorno. Los anticuerpos de la invención comprenden un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2, en los que: (a) el brazo anti-CD3 comprende un primer dominio de unión que comprende: (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184, en el que el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185, en el que el dominio VL comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (b) el brazo anti-HER2 comprende un segundo dominio de unión que comprende: (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 270, en donde el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170, y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171, y (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, en

donde el dominio VL comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173, y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174.

#### 5 **A. Anticuerpos anti-CD3 ejemplares**

En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos aislados que se unen a CD3 (por ejemplo, CD3 $\epsilon$  y/o CD3 $\gamma$ ).

10 Por ejemplo, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD3 que tiene un dominio de unión que comprende seis regiones hipervariables (HVR) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 comprende al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena pesada FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 301-304, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena ligera FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 305-308, respectivamente; adicionalmente, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio variable de la cadena pesada (VH) que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 184 y/o un dominio variable de la cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 185. En otros casos, el anticuerpo anti-CD3 comprende al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena pesada FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 293-296, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena ligera FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 297-300, respectivamente. En un caso particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o pariente clonado del mismo.

30 En otro aspecto, un anticuerpo de la divulgación comprende (a) un dominio VH que comprende las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3; y (b) un dominio VL que comprende las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio VH que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184 y un dominio VL que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185. En un caso particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser 40G5c, o un derivado o pariente clonado del mismo.

40 En cualquiera de los modos de realización anteriores un anticuerpo anti-CD3 es humanizado. En un modo de realización, un anticuerpo anti-CD3 comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además una región estructural humana aceptora, por ejemplo, una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana.

45 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD3, en el que el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente y un VL como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente.

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD3 proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD3 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 184 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 185. En determinados modos de realización de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo en un fragmento de CD3 (por ejemplo, CD3 $\epsilon$  humano) que consiste en los aminoácidos 1-26 (SEQ ID NO: 283) o 1-27 (SEQ ID NO: 278) de CD3 $\epsilon$  humano.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de CD3 único. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-CD3 de la divulgación establece contactos únicos con aminoácidos de CD3 $\epsilon$  humano a una distancia de 3,5 Angstroms, 3,25 Angstroms, 3,00 Angstroms, 2,75 Angstroms o menos. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de CD3 $\epsilon$  humano a una distancia de 3,5 Angstroms, 3,25 Angstroms, 3,00 Angstroms, 2,75 Angstroms o menos. En una de las divulgaciones, el anticuerpo anti-CD3 de la invención establece contactos únicos con aminoácidos de CD3 $\epsilon$  humano a una distancia de 3,5 Angstroms o menos. En determinados modos de realización de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de CD3 $\epsilon$  humano a una distancia de 3,5 Angstroms o menos. Por ejemplo, en determinados modos de realización de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo que consiste en aminoácidos de CD3 $\epsilon$  humano seleccionado de Gln1, Asp2, Asn4, Glu6 y Met7. En un

modo de realización particular de la divulgación, el anticuerpo anti-CD3 se une a un epítipo que incluye específicamente Glu6. En otros modos de realización determinados de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que no se une a un epítipo que incluye el aminoácido Glu5 de CD3ε humano. En otros modos de realización determinados de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que no se une a un epítipo que incluye los aminoácidos Gly3 y Glu5 de CD3ε humano.

Un epítipo anti-CD3 se puede determinar mediante la unión del anticuerpo anti-CD3 a fragmentos peptídicos del epítipo. De forma alternativa, se puede determinar un epítipo anti-CD3 mediante mutagénesis por barrido de alanina. En un modo de realización de la divulgación, una reducción en la unión de un anticuerpo anti-CD3 a CD3 mutado en un 20%, 30%, 50%, 80% o más indica que el residuo de aminoácido de CD3 mutado en un ensayo de mutagénesis por barrido de alanina es un residuo de epítipo para ese anticuerpo anti-CD3. De forma alternativa, se puede determinar un epítipo anti-CD3 mediante espectrometría de masas. En algunos modos de realización de la divulgación, el epítipo se determina mediante cristalografía (por ejemplo, procedimientos de cristalografía descritos en los ejemplos).

En algunos modos de realización de la divulgación, el epítipo determinado mediante cristalografía se determina usando los aminoácidos Q1-M7 de CD3. En algunos modos de realización, el epítipo determinado mediante cristalografía se determina usando los aminoácidos QDGNEEMGGITQTPYK (SEQ ID NO: 284) de CD3.

En algunos modos de realización de la divulgación, el epítipo determinado mediante cristalografía se puede realizar combinando el anticuerpo anti-CD3 Fab, disuelto en NaCl 0,15 M, tris 25 mM, pH 7,5 a 10 mg/ml, con un exceso molar de 2 veces (1 mg) de péptido CD3ε y cribando inicialmente una matriz escasa de precipitantes en un formato de difusión de vapor en forma de gota sentada. Los cristales optimizados se pueden cultivar a partir de una mezcla 1:1 con una solución de depósito que contiene 70 % v/v de metilpentanodiol y tampón HEPES 0,1 M a pH 7,5. El depósito se puede usar como crioprotector. Los cristales se pueden transferir a temperatura criogénica mediante inmersión repentina en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción de los cristales se pueden recopilar en la línea de haz 22ID de la fuente avanzada de fotones, usando un detector CCD MAR300. Las difracciones registradas se pueden integrar y ajustar a escala usando el programa HKL2000.

La estructura se puede escalonar mediante el procedimiento de reemplazo molecular (MR) usando el programa Phaser. Por ejemplo, el modelo de búsqueda de RM es una subunidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido CD3ε está integrado en la estructura basándose en un mapa Fo-Fc. La estructura se puede refinar posteriormente con los programas REFMAC5 y PHENIX usando las funciones objetivo de máxima verosimilitud, el procedimiento de refinamiento del factor B individual anisotrópico y el procedimiento de refinamiento TLS, para lograr la convergencia.

En determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que incluye un paratopo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD3 proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en determinados aspectos de la divulgación se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que comprende aminoácidos que forman contactos a una distancia de 3,5 Angstroms o menos. En determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en aminoácidos de la región VH de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo que comprende 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos de la región VH de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo comprende 33Tyr, 35His, 50Trp, 97Tyr y 98Ser. En determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo que comprende 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu y 96Arg. En determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de la región VL de un anticuerpo anti-CD3 seleccionado del grupo que comprende 27Arg, 27Asn, 30Lys, 32Tyr, 92Phe, 94Leu y 96Arg. En aspectos opcionales de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que no se une al mismo epítipo que un paratopo de anticuerpo anti-CD3 que consiste en aminoácidos de la región VL que comprende 91Ser. En otro aspecto de la divulgación, un anticuerpo anti-CD3 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, que comprende un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-CD3 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')<sub>2</sub>. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG intacto (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto) u otra clase de anticuerpo o isotipo como se define en el presente documento.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD3 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-7 a continuación:

### 1. Afinidad del anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ). En un aspecto de la divulgación, se mide la  $K_d$  mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un modo de realización, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando los Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ( $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando, a continuación, el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con  $5 \mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio  $50 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 9,6$ ) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al  $2 \%$  (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ). En una placa no adsorbente (Nunc, n.º 269620), se mezcla [ $^{125}\text{I}$ ]-antígeno  $100 \text{ pM}$  o  $26 \text{ pM}$  con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599, 1997). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se retira la solución y se lava la placa ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al  $0,1 \%$  en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden  $150 \mu\text{l/pocillo}$  de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que den menos de o igual a un  $20 \%$  de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro modo de realización de la divulgación,  $K_d$  se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  con chips CM5 con antígeno inmovilizado a  $\sim 10$  unidades de respuesta (UR). En un modo de realización de la divulgación, se activan chips de biosensor con dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio  $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 4,8$ , hasta  $5 \mu\text{g/ml}$  ( $\sim 0,2 \mu\text{M}$ ) antes de su inyección a un caudal de  $5 \mu\text{l/minuto}$  para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina  $1 \text{ M}$  para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas 1:2 de Fab (de  $0,78 \text{ nM}$  a  $500 \text{ nM}$ ) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al  $0,05 \%$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a un caudal de aproximadamente  $25 \mu\text{l/min}$ . Se calculan las tasas de asociación ( $k_{\text{as}}$ ) y las tasas de disociación ( $k_{\text{dis}}$ ) usando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calcula como la proporción  $k_{\text{dis}}/k_{\text{as}}$ . Véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede de  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación =  $295 \text{ nm}$ ; emisión =  $340 \text{ nm}$ , paso de banda  $16 \text{ nm}$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  de un anticuerpo anti-antígeno  $20 \text{ nM}$  (forma Fab) en PBS,  $\text{pH } 7,2$ , en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

### 2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización de la divulgación, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH,  $\text{F}(\text{ab}')_2$ , Fv y scFv y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), p. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y  $\text{F}(\text{ab}')_2$  que comprenden residuos de epítopos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En

determinados modos de realización, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

5 Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

### 3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

10 En determinado aspecto de la divulgación, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y en Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "con cambio de clase" en el que se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

20 En determinados modos de realización de la divulgación, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, mientras se conservan la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización de la divulgación, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

30 Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); patentes de EE. UU. n.os 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (que describen el injerto de regiones determinantes de la especificidad (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (que describe el "rebornizado"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (que describen el "reordenamiento de FR"); y Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) y Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).

40 Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); y Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, Front. Biosci., 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véanse, por ejemplo, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997); y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

### 4. Anticuerpos humanos

50 En determinados modos de realización de la divulgación, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen, en general, anticuerpos humanos en van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

55 Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica. Dichos animales contienen típicamente todo o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos se han inactivado, en general, los locus de inmunoglobulina endógena. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.os 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos

intactos generados por dichos animales se pueden modificar además, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

5 También se pueden preparar anticuerpos humanos por procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268, 2006 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humano. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

### 5. Anticuerpos derivados de colecciones

25 Se pueden aislar los anticuerpos de la divulgación cribando colecciones combinatorias para determinar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para detectar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

35 En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, a continuación, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad con respecto al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734, 1993. Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos con anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

### 55 6. Anticuerpos multiespecíficos

En uno cualquiera de los aspectos de la divulgación, el anticuerpo anti-CD3 proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados aspectos, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de CD3 (por ejemplo, CD3ε o CD3γ). En determinados aspectos de la divulgación, una de las especificidades de unión es para CD3 (por ejemplo, CD3ε o CD3γ) y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie celular, por ejemplo, un antígeno tumoral). En consecuencia, un anticuerpo anti-CD3 biespecífico puede tener especificidades de unión para CD3 y una segunda molécula biológica, tal como una segunda molécula biológica (por ejemplo, un antígeno tumoral) enumerada en la Tabla 1 y descrita en la publicación de EE. UU. n.º 2010/0111856.

TABLA 1. Dianas antigénicas tumorales de los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención

CD20	CD79a	ETBR	IL13Ralpha2	M-CSF	P2X5	SSX-2
0772P	CD79b	Proteína de fusión ETV6-AML1	IL20Ra	MCSP	p53	SSX-4
adipofilina	Cdc27	EZH2	Carboxil esterasa intestinal	mdm-2	PAP	STEAP1
AIM-2	CDK4	FcRH1	IRTA2	MDP	PAX5	STEAP1
ALDH1A1	CDKN2 A	FcRH2	Calicreína 4	ME1	PBF	STEAP2
alfa-actinina-4	CEA	FcRH5	KIF20A	Melan - A/MART-1	PMEL17	survivina
alfa-fetoproteína	CLL1	FLT3-ITD	KK-LC-1	Meloe	proteína de fusión pml-RARalpha	SYT-SSX1 o - proteína de fusión SSX2
anfirregulina	CLPP	FN1	KM-HN-1	MMP-2	PRAME	TAG-1
ARTC1	COA-1	G250/MN/CAIX	K-ras	MMP-7	PRDX5	TAG-2
ASLG659	CPSF	GAGE-1,2,8	LAGE-1	MPF	PSCA	telomerasa
ASPHD1	CRIPTO	GAGE-3,4,5,6,7	LDLR-fucosiltransferasaASproteína de fusión	MRP4	PSCA hlg	TENB2
B7-H4	Cw6	GDNF-Ra1	lengsin	MSG783	PSMA	TGF-betaRII
BAFF-R	CXCR5	GEDA	LGR5	MUC1	PTPRK	TMEFF1
BAGE-1	CXORF 61	GFRA1	LY64	MUC5AC	RAB38/NY-MEL-1	TMEM118
BCLX (L)	ciclina D 1	glipicano-3	Ly6E	mucina	RAGE-1	TMEM46
Proteína de fusión BCR-ABL (b3a2)	ciclina-A1	GnTVf	Ly6G6D	MUM-1f	RBAF600	TRAG-3
beta-catenina	dek-can proteína de fusión	gp100/Pmel17	LY6K	MUM-2	RET	Triosafosfato isomerasa
BING-4	DKK1	GPC3	LYPD1	MUM-3	RGS5	TRP-1/gp75
B-RAF	DR1	GNPMB	MAGE-A1	miosina clase I	RhoC	TRP-2
Brevicán	DR13	GPR172A	MAGE-A10	NA88-A	RNF43	TRP2-INT2
CALCA	E16	GPR19	MAGE-A12	Napi2b	RNF43	TrpM4
CASP-5	Y DAR	GPR54	MAGE-A2	ANC	RU2AS	tirosinasa
CASP-8	EFTUD 2	HAVCR1	MAGE-A3	neo-PAP	SAGE	tirosinasa
CD19	factor de elongación 2	HER2	MAGE-A4	NFYC	secernina 1	VEGF
CD21	ENAH (hMena)	HER-2/neu	MAGE-A6	N-ras	Sema 5b	WT1
CD22	EpCAM	HERV-K-MEL	MAGE-A9	NY-BR-1	SIRT2	XAGE-1/GAGED2a
CD33	EphA3	HLA-DOB	MAGE-C1	NY-ESO-1/LAGE-2	SLC35D3	EGFR-T790M;

CD45	EphB2R	hsp70-2	MAGE-C2	OA1	SNRPD1	BMPR1B
CD70	epirregulina	IDO1	mamaglobina -A	OGT	SOX10	
CD72	EGFR	IGF2B3	MART2	OS-9	Sp17	
EGFR-G719A	EGFR-G719C;	EGFR-G719S;	EGFR-L858R	EGFR-S768I	EGFR-L861Q	

El anticuerpo anti-CD3 biespecífico (por ejemplo, uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 descritos anteriormente) puede tener especificidades de unión para CD3 y una segunda molécula biológica tal como un complejo de antígeno leucocitario humano (HLA)-péptido presentado en la superficie celular por MHC. El anticuerpo anti-CD3 biespecífico (por ejemplo, uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 descritos anteriormente) puede tener especificidades de unión para CD3 y una segunda molécula biológica que comprende un complejo HLA-péptido seleccionado del grupo que consiste en 0772P (CA125, MUC16; Genbank n.º de acceso AF36148); adipofilina (perilipina-2, proteína relacionada con la diferenciación adiposa, ADRP, ADFP, MGC10598; secuencia de referencia NCBI: NP\_001113.2); AIM-2 (ausente en melanoma 2, PYHIN4, proteína AIM2 inducible por interferón; secuencia de referencia NCBI: NP\_004824.1); ALDH1A1 (Familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A1, ALDH1, PUMB1, retinaldehído deshidrogenasa 1, ALDC, ALDH-E1, ALHDII, RALDH 1, EC 1.2.1.36, ALDH11, HEL-9, HEL-S-53e, HEL12, RALDH1, acetaldehído deshidrogenasa 1, aldehído deshidrogenasa 1, soluble, aldehído deshidrogenasa, citosólico hepático, ALDH clase 1, proteína luminal del epidídimo 12, proteína luminal del epidídimo 9, proteína secretora de unión al esperma del epidídimo Li 53e, deshidrogenasa de retina 1, RalDH1, miembro de la familia de aldehído deshidrogenasa 1 A1, aldehído deshidrogenasa, citosólica, EC 1.2.1.36, Secuencia de Referencia NCBI: NP\_000680.2); alfa-actinina-4 (ACTN4, actinina, alfa 4, FSGS1, glomeruloesclerosis focal y segmentaria 1, alfa-actinina 4 no muscular, proteína de reticulación de actina F, FSGS, ACTININA-4, isoforma de actinina alfa4, alfa-actinina-4; secuencia de referencia NCBI: NP\_004915.2); alfafetoproteína (AFP, HPAPF, FETA, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, alfa-1-fetoproteína, alfa-fetoglobulina, HP; GenBank: AAB58754.1); anfirregulina (AREG, SDGF, factor de crecimiento derivado de schwannoma, factor de crecimiento derivado de células colorrectales, AR, CRDGF; GenBank: AAA51781.1); ARTC1 (ART1, ADP-ribosiltransferasa 1, mono(ADP-ribosil)transferasa 1, ADP-ribosiltransferasa C2 y C3 similar a la toxina 1, ART2, CD296, RT6, ADP-ribosiltransferasa 2, NAD(P)(+) ligado a GPI –arginina ADP-Ribosiltransferasa 1, EC 2.4.2.31, antígeno CD296 NP); ASLG659; ASPHD1 (1 que contiene el dominio aspartato beta-hidroxilasa, proteína 1 que contiene el dominio aspartato beta-hidroxilasa, EC 1.14.11.-, EC 1.14.11; GenBank: AAI44153.1); B7-H4 (VTCN1, inhibidor 1 de activación de linfocitos T que contiene el dominio V-Set, B7H4, miembro de la superfamilia B7 1 proteína coestimuladora inmune B7-H4, B7h.5, molécula coestimuladora de linfocitos T B7x, B7S1, B7X, VCTN1, H4, miembro de la familia B7, PRO1291, miembro de la familia B7, H4, molécula coestimuladora de linfocitos T B7x, inhibidor 1 de activación de linfocitos T que contiene el dominio V-Set, proteína B7S1 GenBank: AAZ17406.1); BAFF-R (TNFRSF13C, superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 13C, BAFFR, receptor del factor activador de linfocitos B, receptor BAFF, receptor 3 BlyS, CVID4, BROMIX, CD268, receptor del factor activador de linfocitos B, prolixina, miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral 13C, BR3, antígeno CD268; secuencia de referencia NCBI: NP\_443177.1); BAGE-1; BCLX (L); proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); beta-catenina (CTNNB1, catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88 kDa, CTNNB, MRD19, catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1 (88 kD), armadillo, catenina beta-1; GenBank: CAA61107.1); BING-4 (WDR46, dominio de repetición 46 WD, C6orf11, BING4, proteína BING4 que contiene repetición de WD, marco de lectura abierto 11 del cromosoma 6, FP221, UTP7, proteína 46 que contiene repetición de WD; NP); BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea tipo IB, n.º de acceso a Genbank NM\_00120; NP); B-RAF (brevican (BCAN, BEHAB, n.º de acceso a Genbank AF22905); brevican (BCAN, proteoglicano de sulfato de condroitina 7, proteína de unión a hialuronano enriquecida en cerebro, BEHAB, CSPG7, proteoglicano de brevican, proteína central de brevican, proteoglicano de sulfato de condroitina BEHAB; GenBank: AAH27971.1); CALCA (polipéptido alfa relacionado con la calcitonina, CALC1, calcitonina 1, calcitonina, CGRP de tipo alfa, péptido I relacionado con el gen de la calcitonina, CGRP-I, CGRP, CGRP1, CT, KC, calcitonina/polipéptido relacionado con la calcitonina, alfa, katalcalcina; NP); CASP-5 (CASP5, caspasa 5, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis, caspasa 5, cisteína proteasa relacionada con la apoptosis, proteasa ICH-3, proteasa TY, ICE(rel)-III, ICE(rel)III, ICEREL-III, ICH-3, caspasa-5, TY proteasa, EC 3.4.22.58, ICH3, EC 3.4.22); CASP-8; CD19 (CD19 - precursor de la isoforma 2 del antígeno de linfocitos B CD19, B4,CVID3 [Homo sapiens], secuencia de referencia NCBI: NP\_001761.3); CD20 (CD20 - antígeno de linfocitos B CD20, 4 dominios que abarcan la membrana, subfamilia A, miembro 1, B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7; secuencia de referencia NCBI: NP\_690605.1); CD21 (CD21 (CR2 (receptor del complemento o C3DR (receptor del virus C3d/Epstein Barr) o Hs.73792 n.º de acceso del Genbank M2600); (CD22 (isoforma CD22-B del receptor de linfocitos B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, n.º de acceso a Genbank AK02646; CD22; CD33 (molécula CD33, antígeno CD33 (Gp67), lectina 3 similar a Ig de unión a ácido siálico, lectina 3 similar a Ig de unión a ácido siálico, SIGLEC3, gp67; SIGLEC-3, antígeno de superficie de células mieloides CD33, p67, Siglec-3, antígeno CD33 GenBank: AAH28152.1); CD45; CD70 (CD70 - superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 7; antígeno de superficie CD70; antígeno Ki-24; ligando CD27; CD27-L; miembro 7 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral; secuencia de referencia NCBI para especies homo sapiens: NP\_001243.1); CD72 (CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-; 359 aa, pl: 8,66, MW: 40225, TM: 1 [P] cromosoma del gen: 9p13.3, n.º

de acceso a Genbank NP\_001773.); CD79a (CD79a (CD79A, CD79a, alfa asociada a inmunoglobulina, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo en la superficie con moléculas de Ig M, transduce una señal involucrada en la diferenciación de linfocitos B), pl: 4,84, MW: 25028 TM: 2 [P] cromosoma del gen: 19q13.2, n.º de acceso a Genbank NP\_001774.1); CD79b (CD79b (CD79B, CD79b, Igb (beta asociada a inmunoglobulina), B29, n.º de acceso a Genbank NM\_000626 o 1103867); Cdc27 (ciclo de división celular 27, D0S1430E, D17S978E, subunidad 3 del complejo promotor de la anafase, subunidad 3 del complejo promotor de la anafase, ANAPC3, APC3, CDC27Hs, H-NUC, homólogo de CDC27, homólogo del ciclo de división celular 27 (S. cerevisiae), HNUC, NUC2, complejo promotor de la anafase, proteína 3, homólogo del ciclo de división celular 27, homólogo de la proteína 27 del ciclo de división celular, homólogo de Nuc2; AAH11656.1); CDK4 (cinasa 4 dependiente de ciclina, proteína cinasa 4 de división celular, PSK-J3, EC 2.7.11.22, CMM3, EC 2.7.11; secuencia de referencia NCBI: NP\_000066.1); CDKN2A (inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A, MLM, CDKN2, MTS1, inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A (melanoma, P16, inhibe CDK4), inhibidor de cinasa 4 dependiente de ciclina A, supresor de tumores múltiples 1, CDK4I, MTS-1, CMM2, P16, ARF, INK4, INK4A, P14, P14ARF, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16, Inhibidor de CDK4 P16-INK4, regulador negativo del ciclo celular beta, p14ARF, p16-INK4, p16-INK4a, p16INK4A, p19ARF; ACE; CLL1 (CLL-1 (CLEC12A, M1CL y DCAL, codifica un miembro de la superfamilia de lectina de tipo C/dominio similar a lectina de tipo C (CTL/CTLD). Los miembros de esta familia comparten un pliegue proteico común y tienen diversas funciones, tales como la adhesión celular, la señalización entre células, el recambio de glucoproteínas y funciones en la inflamación y la respuesta inmune. La proteína codificada por este gen es un regulador negativo de la función de granulocitos y monocitos. Se han descrito varias variantes de transcripción empalmadas alternativamente de este gen, pero no se ha determinado la naturaleza completa de estas variantes. Este gen está estrechamente relacionado con otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en la región del complejo del gen citolítico natural en el cromosoma 12p13 (Drickamer K Curr. Opin. Struct. Biol. 9):585-90; van Rhenen A, et al., Blood 110):2659-66; Chen CH, et al. Blood 107):1459-67; Marshall AS, et al. Eur. J. Immunol. 36):2159-69; Bakker AB, et al. Cancer Res. 64 :8443-50; Marshall AS, et al. J. Biol. Chem. 279 :14792-80. Se ha demostrado que CLL-1 es un receptor de tipo transmembrana que comprende un único dominio similar a la lectina de tipo C (que no se prevé que se una al calcio o al azúcar), una región de tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta que contiene un motivo ITIM); CLPP (subunidad proteolítica de peptidasa de matriz mitocondrial caseinolítica, endopeptidasa Clp, EC 3.4.21.92, PRLTS3, proteasa dependiente de ATP ClpAP (E. coli), homólogo de ClpP (proteasa caseinolítica, dependiente de ATP, subunidad proteolítica, E. coli), homólogo de ClpP peptidasa caseinolítica dependiente de ATP, subunidad proteolítica (E. Coli), proteasa caseinolítica ClpP, homólogo dependiente de ATP, subunidad proteolítica (E. Coli), humana, subunidad proteolítica, proteasa dependiente de ATP ClpAP, subunidad proteolítica, humana, caseinolítica ClpP peptidasa dependiente de ATP, subunidad proteolítica, peptidasa caseinolítica ClpP, dependiente de ATP, homóloga de subunidad proteolítica, proteasa caseinolítica ClpP, dependiente de ATP, homóloga de subunidad proteolítica, subunidad proteolítica Clp dependiente de ATP, mitocondrial); COA-1; CPSF; CRIPTO (CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, n.º de acceso a Genbank NP\_003203 o NM\_00321); Cw6; CXCR5 CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteína G que se activa mediante la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia 372 aa, pl: 8,54 MW: 41959 TM: 7 [P] cromosoma del gen: 11q23.3, n.º de acceso a Genbank NP\_001707.); CXORF61 CXORF61 - marco de lectura abierto 61 del cromosoma X [Homo sapiens], secuencia de referencia NCBI: NP\_001017978.1); ciclina D1 (CCND1, BCL1, PRAD1, D11S287E, CLL/linfoma 1 de linfocitos B, proteína de linfoma 1 de linfocitos B, oncogén BCL-1, oncogén PRAD1, ciclina D1 (PRAD1: Adenomatosis paratiroidea 1), ciclina D1 específica de G1/S, adenomatosis 1 de paratiroides, U21B31, ciclina-D1 específica de G1/S, BCL-1; secuencia de referencia NCBI: NP\_444284.1); ciclina-A1 (CCNA1, CT146, ciclina A1; GenBank: AAH36346.1); proteína de fusión dek-can; DKK1 (inhibidor 1 de la vía de señalización Dickkopf WNT, SK, hDkk-1, homólogo 1 de Dickkopf (Xenopus Laevis), homólogo 1 de Dickkopf (Xenopus Laevis), DKK-1, homólogo 1 de Dickkopf, proteína 1 relacionada con Dickkopf, similar a Dickkopf-1, Proteína 1 similar a Dickkopf, Proteína 1 relacionada con Dickkopf, Dickkopf-1, Dkk-1; GenBank: AAQ89364.1); DR1 (regulador por disminución de la transcripción 1, unión a TBP (cofactor negativo 2), cofactor negativo 2-beta, fosfoproteína asociada a proteína de unión a TATA, NC2, NC2-BETA, proteína Dr1, NC2-beta, regulador por disminución de la transcripción 1; secuencia de referencia NCBI: NP\_001929.1); DR13 (complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR Beta 1, HLA-DR1B, DRw10, DW2.2/DR2.2, SS1, DRB1, HLA-DRB, antígeno de histocompatibilidad HLA clase II, cadena beta DR-1, antígeno leucocitario humano DRB1, antígeno linfocitario DRB1, antígeno MHC clase II, cadena MHC HLA-DR Beta 1 de clase II, glucoproteína de superficie celular MHC clase II HLA-DR-Beta, MHC clase II HLA-DRw10-Beta, DR-1, DR-12, DR-13, DR-14, DR-16, DR-4, DR-5, DR-7, DR-8, DR-9, DR1, DR12, DR13, DR14, DR16, DR4, DR5, DR7, DR8, DR9, DRw11, DRw8, HLA-DRB2, Clon P2-Beta-3, Antígeno MHC Clase II DRB1\*1, Antígeno MHC Clase II DRB1\*10, Antígeno MHC Clase II DRB1\*11, Antígeno MHC Clase DRB1\*12, Clase MHC Antígeno MHC Clase II DRB1\*13, Antígeno MHC Clase II DRB1\*14, Antígeno MHC Clase II DRB1\*15, Antígeno MHC Clase II DRB1\*16, Antígeno MHC Clase II DRB1\*3, Antígeno MHC Clase II DRB1\*4, Antígeno MHC Clase II DRB1 \*7, antígeno MHC Clase II DRB1\*8, antígeno MHC Clase II DRB1\*9); E16 (E16 (LAT1, SLC7A5, n.º de acceso de Genbank NM\_00348); EDAR (EDAR - miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral precursor de EDAR, receptor EDA-A1; homólogo downless; receptor de ectodisplasina A; receptor de displasia ectodérmica; receptor de ectodisplasina anhidrótica 1, DL; ECTD10A; ECTD10B; ED1R; ED5; EDA1R; HRM1; [Homo sapiens]; secuencia de referencia NCBI: NP\_071731.1); EFTUD2 (factor de elongación Tu que contiene dominio de unión a GTP 2, proteína 2 factor de elongación Tu que

contiene el dominio de unión a GTP, hSNU114, homólogo de SNU114, proteína específica de SnRNP U5, 116 KDa, MFDGA, KIAA0031, 116 KD, proteína específica de SnRNP U5, 116 componente de ribonucleoproteína nuclear pequeña KDa U5, MFDM, SNRNP116, Snrp116, Snu114, U5-116KD, SNRP116, U5-116 KDa; GenBank: AAH02360.1); EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico, ERBB, protooncogén C-ErbB-1, receptor tirosina-proteína cinasa ErbB-1, ERBB1, HER1, EC 2.7.10.1, receptor del factor de crecimiento epidérmico (leucemia eritroblástica aviar viral (V-Erb- B) Homólogo de oncogén), homólogo de oncogén viral de leucemia eritroblástica (V-Erb-B) (aviar), PIG61, homólogo de oncogén viral de leucemia eritroblástica aviar (V-Erb-B), proteína inhibidora del crecimiento celular 40, proteína inductora de proliferación celular 61, mENA, CE 2.7.10; GenBank: AAH94761.1); EGFR-G719A; EGFR-G719C; EGFR-G719S; EGFR-L858R; EGFR-L861Q; EGFR-S7681; EGFR-T790M; factor de elongación 2 (EEF2, factor de elongación de traducción eucariótica 2, EF2, polipeptidil-TRNA translocasa, EF-2, SCA26, EEF-2; secuencia de referencia NCBI: NP\_001952.1); ENAH (hMena) (homólogo habilitado (Drosophila), MENA, habilitado para mamíferos, ENA, NDPP1, homólogo habilitado para proteínas; GenBank: AAH95481.1) - resultados solo para "ENAH", no para "ENAH (hMena)"; EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales, M4S1, MIC18, transductor de señal de calcio asociado a tumores 1, TACSTD1, TROP1, antígeno asociado a adenocarcinoma, glucoproteína de superficie celular Trop-1, glucoproteína epitelial 314, proteína asociada a tumores gastrointestinales mayores GA733-2, EGP314, KSA, DIAR5, HNPCC8, antígeno identificado por anticuerpo monoclonal AUA1, EGP-2, EGP40, ESA, KS1/4, MK-1, glucoproteína-2 epitelial humana, componente de membrana, cromosoma 4, marcador de superficie (glucoproteína de 35 kD), EGP, Ep-CAM, GA733-2, M1S2, antígeno CD326, antígeno de superficie de células epiteliales, hEGP314, antígeno KS 1/4, ACSTD1; GenBank: AAH14785.1); EphA3 (receptor EPH A3, ETK1, ETK, TYRO4, HEK, tirosina cinasa 1 similar a Eph, receptor de tirosina-proteína cinasa ETK1, EK4, cinasa similar a EPH 4, EC 2.7.10.1, EPHA3, HEK4, receptor Ephrin tipo A3, Embrión cinasa 1 humano, proteína tirosina cinasa TYRO4, hEK4, embrión cinasa humana, tirosina-proteína cinasa TYRO4, EC 2.7.10; GenBank: AAH63282.1); EphB2R; epirregulina (EREG, ER, proepiregulina; GenBank: AAI36405.1); ETBR (EDNRB, receptor de endotelina tipo B, HSCR2, HSCR, receptor de endotelina de tipo no selectivo, ET-B, ET-BR, ETRB, ABCDS, WS4A, ETB, receptor de endotelina B; NP); proteína de fusión ETV6-AML1; EZH2 (potenciador de Zeste homólogo 2 (Drosophila), lisina N-metiltransferasa 6, ENX-1, KMT6 EC 2.1.1.43, EZH1, WWS, potenciador de Zeste (Drosophila) homólogo 2, ENX1, EZH2b, KMT6A, WWS2, histona-Lisina N-Metiltransferasa EZH2, potenciador de Zeste homólogo 2, EC 2.1.1; GenBank: AAH10858.1); FcRH1 (FCRL1, similar al receptor Fc 1, FCRH1, homólogo del receptor Fc 1, proteína similar al FcR 1, proteína 5 asociada a la translocación del receptor inmunitario, IFGP1, IRTA5, hIFGP1, proteína 1 de la familia IFGP, CD307a, proteína similar al receptor Fc 1, receptor Fc de la superfamilia de inmunoglobulinas, Gp42, FcRL1, antígeno CD307a; GenBank: AAH33690.1); FcRH2 (FCRL2, receptor similar a Fc 2, SPAP1, proteína de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2 1, homólogo del receptor Fc 2, proteína similar a FcR 2, proteína 4 asociada a la translocación del receptor de inmunoglobulina, FCRH2, IFGP4, IRTA4, proteína 4 de la familia IFGP, SPAP1A, SPAP1B, SPAP1C, CD307b, proteína similar al receptor Fc 2, proteína 4 asociada a la translocación del receptor inmunitario, receptor Fc de la superfamilia de inmunoglobulinas, Gp42, dominio SH2 que contiene la proteína de anclaje de fosfatasa 1, FcRL2, antígeno CD307b; GenBank: AAQ88497.1); FcRH5 (FCRL5, receptor similar a Fc 5, IRTA2, homólogo del receptor Fc 5, proteína similar a FcR 5, proteína 2 asociada a la translocación del receptor inmunitario, BXMAS1, FCRH5, CD307, CD307e, PRO820, proteína similar al receptor Fc 5, superfamilia de inmunoglobulinas translocación del receptor asociado 2 (IRTA2), FcRL5, antígeno CD307e; GenBank: AAI01070.1); FLT3-ITD; FN1 (fibronectina 1, globulina insoluble en frío, FN, factor estimulante de la migración, CIG, FNZ, GFND2, LETS, ED-B, FINC, GFND, MSF, fibronectina; GenBank: AAI43764.1); G250 (MN, CAIX, anhidrasa carbónica IX, deshidratasa carbónica, proteína G250 asociada al CCR, carbonato deshidratasa IX, antígeno de membrana MN, antígeno G250 asociado al carcinoma de células renales, CA-IX, P54/58N, pMW1, antígeno G250 asociado al CCR, anhidrasa carbónica 9 NP); - resultados de alias para "G250" y no para "G250 / MN / CAIX"; GAGE-1,2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GDNF-Ra1 (receptor alfa 1 de la familia GDNF; GFRA1; GDNFR; GDNFRA; RETL1; TRNR1; RET1L; GDNFR-alfa1; GFR-ALPHA-; U95847; BC014962; NM\_145793 NM\_005264); GEDA (n.º de acceso a Genbank AY26076); GFRA1: receptor alfa-1 de la familia GDNF; Receptor alfa-1 de GDNF; GDNFR-alfa-1; TFG-alfa-1; ligando RET 1; receptor 1 del factor neurotrófico relacionado con TGF-beta [Homo sapiens]; ProtKB/Swiss-Prot: P56159.2; glipicano-3 (GPC3, glipicano 3, SDYS, glipicano proteoglicano 3, proteína intestinal OCI-5, GTR2-2, MXR7, SGBS1, DGXS, OCI-5. SGB, SGBS, proteoglicano de sulfato de heparán, glipicano-3 secretado, OCI5; GenBank: AAH35972.1); GntVf; gp100 (PMEL, proteína de premelanosoma, SILV, D12S53E, PMEL17, SIL, proteína de melanocitos Pmel 17, antígeno específico del linaje de melanocitos GP100, antígeno ME20 asociado al melanoma, homólogo de proteína del locus de plata, ME20-M, ME20M, P1, P100, plata (Homólogo de ratón) como, homólogo de plata (ratón), ME20, SI, proteína de melanocitos Mel 17, proteína de melanocitos PMEL, proteína de matriz melanosomal 17, plata, ratón, homólogo de; GenBank: AAC60634.1); GPC; GPNMB (glucoproteína (transmembrana) Nmb, glucoproteína NMB, glucoproteína similar a Nmb, osteoactivina, glucoproteína transmembrana HGFIN, HGFIN, NMB, glucoproteína transmembrana, glucoproteína transmembrana NMB; GenBank: AAH32783.1); GPR172A (receptor 172A acoplado a proteína G; GPCR41; FLJ11856; D15Ert4747e); NP\_078807.1; NM\_024531.3); GPR19 (receptor 19 acoplado a proteína G; Mm.478; NP\_006134.1; NM\_006143.2); GPR54 (receptor KISS1; KISS1R; GPR54; HOT7T175; AXOR1; NP\_115940.2; NM\_032551.4); HAVCR1 (receptor celular 1 del virus de la hepatitis A, miembro 1 de la familia de mucina de inmunoglobulina de linfocitos T, molécula de lesión renal 1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1, receptor 1 de mucina de inmunoglobulina de linfocitos T, proteína 1 de membrana de linfocitos T, HAVCR, HAVCR-1, proteína 1 de dominio de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio de mucina, HAVcr-1, proteína 1 que contiene inmunoglobulina de linfocitos T y dominio de mucina; GenBank AAH13325.1); HER2 (ERBB2, homólogo 2 del

oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar V-Erb-B2, NGL, NEU, homólogo del oncogén derivado de neuro/glioblastoma, proteína del gen 19 del ganglio linfático metastásico, protooncogén C-ErbB-2, protooncogén Neu, tirosina Receptor de superficie celular tipo cinasa HER2, MLN 19, p185erbB2, EC 2.7.10.1, V-Erb-B2 homólogo 2 del oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar (homólogo de oncogén derivado de neuro/glioblastoma), CD340, HER-2, HER-2/neu, TKR1, proteína C-Erb B2/Neu, herstatina, homólogo de oncogén derivado de neuroblastoma/glioblastoma, receptor tirosina-proteína cinasa ErbB-2, homólogo de oncogén viral de leucemia eritroblástica V-Erb-B2 2, homólogo de oncogén derivado de neuro/glioblastoma, MLN19, antígeno CD340, EC 2.7.10; HER-2/neu - alias de arriba; HERV-K-MEL; HLA-DOB (subunidad beta de la molécula MHC clase II (antígeno Ia) que une péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6,56, MW: 30820.TM: 1 [P] cromosoma del gen: 6p21.3, n.º de acceso a Genbank NP\_002111); hsp70-2 (HSPA2, proteína 2 de choque térmico de 70 kDa, proteína 2 de choque térmico de 70 kDa, HSP70-3, proteína 2 de 70 kDa relacionada con el choque térmico, proteína 2 de choque térmico de 70 kDa; GenBank: AAD21815.1); IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenasa 1, IDO, INDO, indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa, IDO-1, indolamina-pirrol 2,3 dioxigenasa, indolamina 2,3 dioxigenasa, indol 2,3 dioxigenasa, EC 1.13. 11.52; secuencia de referencia NCBI: NP\_002155.1); IGF2B3; IL13Ralpha2 (IL13RA2, receptor de interleucina 13, alfa 2, antígeno 19 de cáncer/testículo, proteína de unión a interleucina-13, IL-13R-alfa-2, IL-13RA2, subunidad alfa-2 del receptor de IL-13, subunidad alfa de IL-13R -2, CD213A2, CT19, IL-13R, IL13BP, proteína de unión a interleucina 13, cadena alfa 2 del receptor de interleucina 13, subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13, IL13R, antígeno CD213a2); IL20Rα; Carboxil esterasa intestinal; IRTA2 (alias de FcRH5); Calicreína 4 (KLK4, peptidasa 4 relacionada con la calicreína, PRSS17, EMSP1, serina proteinasa 1 de la matriz del esmalte, proteína similar a la calicreína 1, serina proteasa 17, KLK-L1, PSTS, A12A1, calicreína 4 (prostasa, matriz del esmalte, próstata), ARM1, EMSP, mensaje regulado por andrógenos 1, serina proteasa 1 de la matriz del esmalte, calicreína, calicreína-4, prostasa, EC 3.4.21.-, prostasa, EC 3.4.21; AAX30051.1); KIF20A (miembro de la familia Kinesin 20A, RAB6KIFL, interacción RAB6, similar a Kinesin (Rabkinesin6), mitótico a; LAGE-1; proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS; Lengsin (LGSN, Lengsin, proteína de lente con dominio de glutamina sintetasa, GLULD1, ligasa de glutamato-amoniaco) proteína que contiene el dominio 1, LGS, dominio glutamato-amoniaco ligasa (glutamina sintetasa) que contiene 1, dominio glutamato-amoniaco ligasa (glutamina sintasa) que contiene 1, similar a la glutamina sintasa de lente; GenBank: AAF61255.1); LGR5 (receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina; GPR49, GPR6; NP\_003658.1; NM\_003667.2; LY64 (antígeno de linfocitos 64 (RP10, proteína de membrana tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula La activación y apoptosis de los linfocitos B, la pérdida de función se asocia con una mayor actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico 661 aa, pl: 6,20, MW: 74147 TM: 1 [P] cromosoma del gen: 5q12, n.º de acceso a Genbank NP\_005573.; Ly6E (complejo de antígeno linfocitario 6, locus E; Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-; NP\_002337.1; NM\_002346.2); Ly6G6D (complejo de antígeno linfocitario 6, locus G6D; Ly6-D, MEGT; NP\_067079.2; NM\_021246.2); LY6K (complejo de antígeno linfocitario 6, locus K; LY6K; HSJ001348; FLJ3522; NP\_059997.3; NM\_017527.3); LyPD1 - dominio LY6/PLAUR que contiene 1, PHTS [Homo sapiens], GenBank: AAH17318.1); MAGE-A1 (familia de antígenos de melanoma A, 1 (dirige la expresión del antígeno MZ2-E, MAGE1, familia de antígenos de melanoma A 1, MAGEA1, antígeno de melanoma MAGE-1, antígeno 1 asociado a melanoma, antígeno asociado a melanoma MZ2-E, antígeno MZ2-E, antígeno 1.1 de cáncer/testículo, CT1.1, antígeno MAGE-1, familia 1 de antígeno de cáncer/testículo, miembro 1, familia 1 de antígeno de cáncer/testículo, miembro 1, MAGE1A; secuencia de referencia NCBI: NP\_004979.3); MAGE-A10 (MAGEA10, antígeno de melanoma, familia A, 10, MAGE10, antígeno MAGE-10, antígeno asociado a melanoma 10, antígeno de cáncer/testículo 1.10, CT1.10, antígeno de cáncer/testículo, familia 1, miembro 10, antígeno de cáncer/testículo Familia 1, Miembro 10; secuencia de referencia NCBI: NP\_001238757.1); MAGE-A12 (MAGEA12, familia de antígenos de melanoma A, 12, MAGE12, antígeno de cáncer/testículo 1.12, CT1.12, antígeno MAGE12F, familia de antígeno de cáncer/testículo 1, miembro 12, familia de antígeno de cáncer/testículo 1, miembro 12, -antígeno 12 asociado a melanoma, antígeno MAGE-12; secuencia de referencia NCBI: NP\_001159859.1); MAGE-A2 (MAGEA2, familia de antígenos de melanoma A, 2, MAGE2, antígeno 1.2 de cáncer/testículo, CT1.2, MAGEA2A, antígeno MAGE-2, familia 1 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 2, familia 1 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 2, antígeno 2 de melanoma, antígeno 2 asociado a melanoma; secuencia de referencia NCBI: NP\_001269434.1); MAGE-A3 (MAGEA3, familia de antígenos de melanoma A, 3, MAGE3, antígeno MAGE-3, antígeno MZ2-D, antígeno 3 asociado a melanoma, antígeno 1.3 de cáncer/testículo, CT1.3, familia 1 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 3, HIP8, HYPD, MAGEA6, familia 1 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 3; secuencia de referencia NCBI: NP\_005353.1); MAGE-A4 (MAGEA4, familia de antígenos de melanoma A, 4, MAGE4, antígeno 4 asociado a melanoma, antígeno 1.4 de cáncer/testículo, CT1.4, antígeno MAGE-4, antígeno MAGE-41, antígeno MAGE-X2, MAGE4A, MAGE4B, familia 1 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 4, MAGE-41, MAGE-X2, familia 1 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 4; secuencia de referencia NCBI: NP\_001011550.1); MAGE-A6 (MAGEA6, familia de antígenos de melanoma A, 6, MAGE6, antígeno MAGE-6, antígeno 6 asociado a melanoma, antígeno de cáncer/testículo 1.6, CT1.6, antígeno MAGE3B, familia de antígenos de cáncer/testículo 1, familia de antígenos de melanoma A 6, miembro 6, MAGE-3b, MAGE3B, familia 1 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 6; secuencia de referencia NCBI: NP\_787064.1); MAGE-A9 (MAGEA9, antígeno de melanoma, familia A, 9, MAGE9, antígeno MAGE-9, antígeno 9 asociado a melanoma, antígeno de cáncer/testículo 1.9, CT1.9, antígeno de cáncer/testículo, familia 1, miembro 9, antígeno de cáncer/testículo Familia 1, Miembro 9, MAGEA9A; Secuencia de referencia NCBI: NP\_005356.1); MAGE-C1 (MAGEC1, familia de antígenos de melanoma C, 1, antígeno de cáncer/testículo 7.1, CT7.1, antígeno MAGE-C1, familia de antígenos de cáncer/testículo 7, miembro 1, CT7, familia de antígenos de cáncer/testículo 7, miembro 1, antígeno C1 asociado al melanoma; secuencia de referencia NCBI: NP\_005453.2); MAGE-C2 (MAGEC2, antígeno

de melanoma familia C, 2, MAGEE1, antígeno 10 de cáncer/testículo, CT10, HCA587, antígeno de melanoma, familia E, 1, específico de cáncer/testículo, antígeno 587 asociado a carcinoma hepatocelular, antígeno MAGE-C2, antígeno MAGE-E1, antígeno 587 del cáncer hepatocelular, antígeno C2 asociado a melanoma; secuencia de referencia NCBI: NP\_057333.1); mamaglobina-A (SCGB2A2, secretoglobina, familia 2A, miembro 2, MGB1, mamaglobina 1, UGB2, mamaglobina A, mamaglobina-A, mamaglobina-1, familia de secretoglobina 2A miembro 2; NP); MART2 (HHAT, aciltransferasa de erizo, SKI1, antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T 2, proteína de erizo flaco 1, Skn, antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T 2, proteína-cisteína N-palmitoiltransferasa HHAT, EC 2.3.1.-; GenBank: AAH39071.1); M-CSF (CSF1, factor estimulante de colonias 1 (macrófagos), MCSF, CSF-1, lanimostim, factor estimulante de colonias de macrófagos 1, lanimostim; GenBank: AAH21117.1); MCSP (SMCP, proteína rica en cisteína asociada a las mitocondrias del esperma, MCS, selenoproteína de la cápsula mitocondrial, HSMCSGEN1, proteína rica en cisteína asociada a las mitocondrias del esperma; secuencia de referencia NCBI: NP\_109588.2); XAGE-1b/GAGED2a; WT1 (Tumor de Wilms 1, WAGR, GUD, WIT-2, WT33, dominio aminoterminal de EWS, NPHS4, últimos tres dedos de zinc del dominio de unión al ADN de WT1, AWT1, proteína del tumor de Wilms, EWS-WT1; GenBank: AAB33443.1); VEGF; tirosinasa (TYR; OCA1A; OCA1A; tirosinasa; SHEP; NP\_000363.1; NM\_000372.4; GenBank: AAB60319.1); TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, n.º de acceso a Genbank NM\_01763); TRP2-INT2; PRT-2; TRP-1/gp75 (Proteína relacionada con tirosinasa 1, 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico oxidasa, CAS2, CATB, TYRP, OCA3, catalasa B, b-PROTEÍNA, glucoproteína 75, EC 1.14.18., antígeno de melanoma Gp75, TYRP1, TRP, TYRRP, TRP1, SHEP11, DHICA oxidasa, EC 1.14.18, GP75, EC 1.14.18.1; triosafosfato isomerasa (triosafosfato isomerasa 1, TPID, triosafosfato isomerasa, HEL-S-49, TIM, epidídimo proteína secretora Li 49, TPI, triosafosfato isomerasa, EC 5.3.1.1 (miembro 2 de la familia CSAG, familia 24 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 2 de la familia CSAG3B, miembro 3B de la familia CSAG, miembro 2 de la familia de antígenos de cáncer/testículos, antígeno 24.2 de cáncer/testículo, proteína del gen 2/3 asociado al condrosarcoma, proteína del gen 3 asociado a la resistencia al taxol, proteína similar al gen 2/3 asociado al condrosarcoma, CT24.2, gen 3 asociado a la resistencia al taxol, TRAG-3, CSAG3A, TRAG3); TMEFF1 (proteína transmembrana con dominios 1 similares a EGF y dos similares a folistatina; tomoregulin-; H7365; C9orf2; C9ORF2; U19878; X83961; NM\_080655; NM\_003692; TGF-betaRII (TGFB2, factor de crecimiento transformante, receptor beta II (70/80 kDa), TGFbeta-RII, MFS2, tbetaR-II, TGFR-2, receptor TGF-Beta Tipo IIB, receptor TGF-beta tipo II, receptor TGF-beta tipo-2, EC 2.7.11.30, receptor beta del factor de crecimiento transformante tipo IIC, AAT3, TbetaR-II, factor de crecimiento transformante, receptor beta II (70-80 kD), receptor TGF-beta tipo II, FAA3, factor de crecimiento transformante-receptor beta tipo II, LDS1B, HNPCC6, LDS2B, LDS2, RIIC, EC 2.7.11, TAAD2; TENB2 (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano transmembrana putativo, relacionado con la familia de factores de crecimiento EGF/herregulina y folistatina, Adhesión al); 374 aa, acceso NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSec: NP\_057276; Gen NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; n.º de acceso a Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; TAG-2; TAG-1 (contactina 2 (axonal), TAG-1, AXT, molécula de adhesión celular de axonina-1, TAX, contactina 2 (expresada transitoriamente), TAX1, contactina-2, glucoproteína axonal TAG-1, glucoproteína axonal expresada transitoriamente, glucoproteína axonal transitoria, axonina-1, TAX-1, TAG1, FAME5; PRF: 444868); proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2; survivina; STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígeno epitelial transmembrana de la próstata 2, seis proteínas prostáticas transmembrana, n.º de acceso a Genbank AF45513; STEAP1 (seis antígeno epitelial transmembrana de próstata, n.º de acceso a Genbank NM\_01244; SSX-2 (SSX2, sarcoma sinovial, punto de interrupción X 2, punto de interrupción X 2, SSX, punto de interrupción X 2B, antígeno de cáncer/testículo 5.2, relacionado con el cromosoma X 2, antígeno tumoral HOM-MEL-40, CT5.2, HD21, familia 5 de antígenos de cáncer/testículo, HOM-MEL-40, isoforma B, familia 5 de antígenos de cáncer/testículo, miembro 2a, miembro 2a, proteína SSX2, sarcoma, sarcoma sinovial, sarcoma sinovial relacionado con el cromosoma X 2, punto de interrupción X 2B, sarcoma sinovial, SSX2A; SOX10 (SRY (región determinante del sexo Y)-Box 10, ratón, PCWH, DOM, WS4, WS2E, WS4C; megacolon dominante, ratón, homólogo humano de, megacolon dominante, gen 10 de HMG-Box relacionado con SRY, homólogo humano de, factor de transcripción SOX-10; GenBank: CAG30470.1); SNRPD1 (ribonucleoproteína nuclear pequeña D1, ribonucleoproteína nuclear pequeña D1, polipéptido de 16 kDa, polipéptido (16 kD), SNRPD, HsT2456, Sm-D1, SMD1, autoantígeno Sm-D, polipéptido de ribonucleoproteína D1 nuclear pequeña, pseudogén de 16 kDa, proteína central SnRNP D1, proteína nuclear pequeña Ribonucleoproteína Sm D1; SLC35D3 (familia de portadores de soluto 35, miembro D3, FRCL1, proteína similar a conexión Fringe 1, bA55K22.3, Frc, similar a Fringe 1, miembro D3 de la familia de portadores de soluto 35; NCBI GenBank: NC\_000006.11 NC\_018917.2 NT\_025741.16); SIRT2 (sirtuina 2, desacetilasa dependiente de NAD, sirtuina-2, SIRT2, regulador de información silenciosa 2, proteína reguladora homóloga 2 de SIR2, proteína tipo 2 relacionada con Sir2, proteína similar a SIR2 2, sirtuina tipo 2, sirtuina (regulación de información de tipo de apareamiento silencioso) 2 homólogo) 2 (S.Cerevisiae), Sirtuin-2, Sirtuin (Reglamento de información de tipo de apareamiento silencioso 2, S.Cerevisiae, homólogo) 2, EC 3.5.1., SIR2; GenBank: AAK51133.1); Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaphorin 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, n.º de acceso a Genbank AB04087; secernina 1 (SCRN1, SES1, KIAA0193, secerina-1; GenBank: EAL24458.1); SAGE (SAGE1, antígeno 1 de sarcoma, antígeno 14 de cáncer/testículo, CT14, antígeno tumoral putativo; secuencia de referencia NCBI: NP\_061136.2); RU2AS (KAAG1, antígeno 1 asociado al riñón, RU2AS, proteína del gen antisentido RU2, antígeno 1 asociado al riñón; GenBank: AAF23613.1); RNF43 - precursor de RNF43 de ubiquitina-proteína ligasa E3 [Homo sapiens], RNF124; URCC; secuencia de referencia NCBI: NP\_060233.3;

RhoC (RGS5 (regulador de la señalización de la proteína G 5, MSTP032, regulador de la señalización de la proteína G 5, MSTP092, MST092, MSTP106, MST106, MSTP129, MST129; GenBank: AAB84001.1); RET (protooncogén ret; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; PTC; CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-ELE; NP\_066124.1; NM\_020975.4); RBAF600 (UBR4, ubiquitina proteína ligasa E3 componente N-Recognin 4, dedo de zinc, UBR1 tipo 1, ZUBR1, E3 ubiquitina-proteína ligasa UBR4, RBAF600, factor asociado a proteína de retinoblastoma de 600 kDa, proteína tipo UBR1 con dedo de zinc 1, EC 6.3.2., N-reconocimiento-4, KIAA0462, p600, EC 6.3.2, KIAA1307; GenBank: AAL83880.1); RAGE-1 (MOK, proteína cinasa MOK, antígeno tumoral renal, RAGE, cinasa superpuesta MAPK/MAK/MRK, antígeno tumoral renal 1, antígeno del carcinoma de células renales, RAGE-1, EC 2.7.11.22, RAGE1; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UQ07.1); RAB38/NY-MEL-1 (RAB38, NY-MEL-1, RAB38, miembro de la familia de oncogén RAS, antígeno de melanoma NY-MEL-1, proteína de unión a GTP relacionada con Rab, proteína Rab-38 relacionada con Ras, rrGTPbp; GenBank : AAH15808.1); PTPRK (DJ480J14.2.1 (proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, K R-PTP-KAPPA, proteína tirosina fosfatasa kappa, proteína tirosina fosfatasa kappa), proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, K, proteína-tirosina fosfatasa kappa, proteína-tirosina fosfatasa, tipo de receptor, kappa, R-PTP-kappa, tirosina-proteína fosfatasa kappa de tipo receptor, EC 3.1.3.48, PTPK: GenBank: AAI44514.1); PSCA; PSCA hlg(2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, gen de ADNc de RIKEN 2700050C12, n.º de acceso a Genbank AY358628); PSCA (precursor del antígeno de células madre de la próstata, n.º de acceso a Genbank AJ29743; PRDX5 (peroxiredoxina 5, EC 1.11.1.15, TPx tipo VI, B166, enzima antioxidante B166, HEL-S-55, tejido hepático 2D-Page Spot 71B, PMP20, enzima antioxidante peroxisomal, PRDX6, tioredoxina peroxidasa PMP20, PRXV, AOEB166, proteína secretora del epidídimo Li 55, correpresor de aluminio 1, peroxiredoxina-5, mitocondrial, peroxiredoxina V, prx-V, tioredoxina reductasa, Prx-V, ACR1, correpresor de aluminio, PLP; GenBank: CAG33484.1); PRAME (antígeno expresado preferentemente en melanoma, antígeno de melanoma expresado preferentemente, MAPE, OIP-4, OIPA, CT130, antígeno 130 de cáncer/testículo, antígeno de melanoma expresado preferentemente en tumores, proteína 4 que interactúa con opa, proteína OIP4 que interactúa con opa; GenBank: CAG30435.1); proteína de fusión pml-RARalfa; PMEL17 (homólogo de plata; SILV; D12S53E; PMEL17; SI; SIL); ME20; gp10 BC001414; BT007202; M32295; M77348; NM\_006928; PBF (ZNF395, proteína de dedo de zinc 395, PRF-1, regulador de la enfermedad de Huntington, proteína de unión a región reguladora del gen HD, proteína 2 de unión a región, proteína 2, factor regulador 1 del virus del papiloma, factor regulador 2 de HD, factor regulador del virus del papiloma, PRF1, HDBP-2, Si-1-8-14, HDBP2, proteína 2 de unión a la región reguladora del gen de la enfermedad de Huntington, HDRF-2, factor regulador del virus del papiloma PRF-1, PBF: GenBank: AAH01237.1); PAX5 (caja emparejada 5, gen homeótico 5 de caja emparejada, BSAP, proteína de caja emparejada Pax-5, activador específico del linaje de linfocitos B, gen 5 del dominio emparejado, gen 5 de caja emparejada (proteína activadora específica del linaje de linfocitos B), linfocitos B -Factor de transcripción específico, gen de caja emparejada 5 (activador específico del linaje de linfocitos B PAP (REG3A, 3 alfa regenerador derivado de los islotes, INGAP, PAP-H, proteína pancreática hepatointestinal, PBBCGF, péptido proislet humano, REG-III, pancreatitis); -proteína asociada 1, Reg3, Reg III-alfa, hepatocarcinoma-intestino-páncreas, proteína III-alfa derivada de los islotes regeneradores, factor de crecimiento de linfocitos beta pancreáticas, HIP, proteína homóloga de PAP, HIP/PAP, proteína inductora de proliferación 34, PAP1, proteína 42 inductora de proliferación, REG-3-alfa, proteína 3-alfa regeneradora derivada de islotes, proteína asociada a pancreatitis: GenBank: AAH36776.1); p53 (TP53, proteína tumoral P53, TPR53, P53, antígeno tumoral celular P53, antígeno NY-CO-13, proteína tumoral mutante 53, fosfoproteína P53, supresor tumoral P53, BCC7, proteína 53 relacionada con la transformación, LFS1, proteína tumoral 53, síndrome de Li-Fraumeni, supresor tumoral P53; P2X5 (canal iónico 5 activado por ligando del receptor purinérgico P2X, un canal iónico activado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detrusor); 422 aa, pl: 7,63, MW: 47206 TM: 1 [P] cromosoma del gen: 17p13.3, n.º de acceso a Genbank NP\_002552.; OGT (N-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa ligada a O, subunidad P110 de la transferasa O-GlcNAc, transferasa de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligada a O (UDP-N-Acetilglucosamina: polipéptido-N-acetilglucosaminil transferasa, UDP-N-acetilglucosamina- - péptido N-acetilglucosaminiltransferasa subunidad de 110 KDa, UDP-N-acetilglucosamina:polipéptido-N-acetilglucosaminiltransferasa, uridinadifosfo-N-acetilglucosamina:polipéptido beta-N-acetilglucosaminiltransferasa, O-GlcNAc transferasa subunidad P110, EC 2.4.1.255, O- subunidad enlazada de N-acetilglucosamina transferasa de 110 KDa, EC 2.4.1, HRNT1, EC 2.4.1.186, O-GLCNAC: GenBank: AAH38180.1); OA1 (Osteoarthritis QTL 1, OASD; GenBank: CAA88742.1); NY-ESO-1/LAGE-2 (cáncer/antígeno de testículo 1B, CTAG1B, NY-ESO-1, LAGE-2, ESO1, CTAG1, CTAG, LAGE2B, cáncer/antígeno de testículo 1, cáncer autoinmunógeno/antígeno de testículo NY-ESO -1, antígeno 3 de Ancer, antígeno 6.1 de cáncer/testículo, carcinoma de células escamosas de esófago de Nueva York 1, miembro 2 de la familia del antígeno L, LAGE2, CT6.1, LAGE2A; GenBank: AAI30365.1); NY-BR-1 (ANKRD30A, dominio repetido de anquirina 30A, antígeno de cáncer de mama NY-BR-1, antígeno de cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-1, proteína 30A que contiene el dominio repetido de anquirina; secuencia de referencia NCBI: NP\_443723.2); N-ras (NRAS, homólogo del oncogén viral RAS del neuroblastoma (V-Ras), NRAS1, proteína transformadora N-Ras, GTPasa NRas, ALPS4, proteína N-Ras parte 4, NS6, homólogo del oncogén, HRAS1; GenBank: AAH05219.1); NFYC (factor de transcripción nuclear Y, gamma, HAP5, HSM, subunidad C del factor de transcripción nuclear Y, transactivador HSM-1/2, subunidad C del factor de unión a CCAAT, NF-YC, subunidad gamma del factor de unión a transcripción CCAAT, proteína de unión al ADN de la caja CAAT Subunidad C, factor de transcripción de histona H1, subunidad grande 2A, CBFC, factor de transcripción nuclear Y, subunidad gamma, CBF-C, transactivador HSM-1, H1TF2A, factor de transcripción NF-Y, subunidad C neo-PAP (PAPOLG, poly(A) polimerasa gamma, neo-poli(A) polimerasa, poli(A) polimerasa gamma nuclear, polinucleótido adeniltransferasa gamma, SRP ARN 3'-enzima adenilante/pap2, PAP-gamma, neo-PAP, SRP ARN

3'-enzima adenilante, PAP2, EC 2.7.7.19, PAPG; secuencia de referencia NCBI: NP\_075045.2); NCA (CEACAM6, n.º de acceso a Genbank M1872); Napi3b (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, familia de transportadores de solutos 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b, n.º de acceso a Genbank NM\_00642); Miosina clase I; MAMÁ-3; MUM-2 (TRAPPC1, complejo de partículas de proteína de tráfico 1, BET5, homólogo de BET5, MUM2, mutación ubicua de melanoma 2, proteína de mieloma múltiple 2, subunidad 1 del complejo de partículas de proteína de tráfico; MUM-1f, mucina (MUC1, mucina 1, asociada a la superficie celular), PEMT, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, enfermedad renal quística medular 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, antígeno DF3 asociado al carcinoma de mama, MAM6, antígeno canceroso 15-3, MCD, mucina asociada a carcinoma, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, mucina urinaria reactiva al maní, MUC1/ZD, antígeno de membrana epitelial asociado a tumores, antígeno DF3, mucina asociada a tumores, episialina, EMA, H23 antígeno, H23AG, mucina-1, KL-6, mucina epitelial asociada a tumores, MUC-1, episialina, PEM, antígeno CD227 UniProtKB/Swiss-Prot: P15941.3); MUC5AC (mucina 5AC, moco oligomérico/formador de gel, mucina traqueobronquial; MUC5, TBM, mucina 5, subtipos A y C, traqueobronquial/gástrico, leB, mucina gástrica, mucina 5AC, pseudogén formador de gel/moco oligomérico, antígeno del grupo sanguíneo Lewis B, LeB, glucoproteína de las vías respiratorias principales, MUC-5AC, mucina-5 subtipo AC, traqueobronquial; MUC1 (mucina 1, asociada a la superficie celular, PEMT, PUM, CA 15-3, MCKD1, ADMCKD, enfermedad renal quística medular 1 (autosómica dominante), ADMCKD1, mucina 1, transmembrana, CD227, antígeno asociado al carcinoma de mama DF3, MAM6, antígeno canceroso 15-3, MCD, mucina asociada al carcinoma, MCKD, Krebs Von Den Lungen-6, MUC-1/SEC, mucina urinaria reactiva al maní, MUC-1/X, mucina epitelial polimórfica, MUC1/ZD, tumor- antígeno de membrana epitelial asociado, antígeno DF3, mucina asociada a tumores, episialina, EMA, antígeno h23, H23AG, mucina-1, KL-6, mucina epitelial asociada a tumores, MUC-1, episialina, PEM, antígeno CD227 MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, n.º de acceso a Genbank NM-01776; isoforma 3 de la proteína 4 asociada a resistencia a múltiples fármacos, MOAT-B [Homo sapiens]; secuencia de referencia NCBI: NP\_001288758.1; MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, n.º de acceso a Genbank NM\_00582; MMP-7 (MMP7, matrilisina, MPPL1, matrinxina, metaloproteínasa de matriz 7 (matrilisina, uterina), matrilisina uterina, metaloproteínasa de matriz-7, EC 3.4.24.23, Pump-1, matrinxina, metaloproteínasa uterina, PUMP1, MMP-7, EC 3.4.24, PUMP-1; GenBank: AAC37543.1); MMP-2 (MMP2, metalopeptidasa de matriz 2 (gelatinasa A, gelatinasa de 72 kDa, colagenasa tipo IV de 72 kDa), MONA, CLG4A, metaloproteínasa de matriz 2 (gelatinasa A, gelatinasa de 72 kDa, colagenasa tipo IV de 72 kDa), CLG4, gelatinasa de 72 kDa, tipo IV de 72 kDa colagenasa), metaloproteínasa de matriz-2, MMP-II, gelatinasa de 72 kDa, colagenasa tipo IV-A, MMP-2, metaloproteínasa de matriz-II, TBE-1, gelatinasa de neutrófilos, EC 3.4.24.24, EC 3.4.24; GenBank: AAH02576.1); y Meloe.

Los anticuerpos anti-CD3 de la invención comprenden un primer dominio de unión que comprende en las seis regiones hipervariables (HVR) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, tal como 40G5c, y tienen un segundo dominio de unión que se une a HER2. El segundo dominio de unión que se une a HER 2 comprende las seis regiones hipervariables (HVR) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174, tal como posee el anticuerpo anti-HER2, hu4D5. En algunos casos, el segundo dominio de unión que se une a HER2 comprende al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena pesada FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 549-552, respectivamente, y/o al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de las regiones estructurales de la cadena ligera FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 553-556, respectivamente. El segundo dominio de unión que se une a HER2 comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 270; y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con, o la secuencia de, SEQ ID NO: 271.

En algunos aspectos de la divulgación, también se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un antígeno tumoral, tal como un antígeno tumoral enumerado en la Tabla 1 (por ejemplo, CD20, FcRH5, HER2, LYPD1, LY6G6D, PMEL17, LY6E, CD19, CD33, CD22, CD79A, CD79B, EDAR, GFRA1, MRP4, RET, Steap1 o TenB2). Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de la cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véanse Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), documento WVO 93/08829, y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). La genomanipulación de "botón en ojal" de anticuerpos multiespecíficos se puede utilizar para generar un primer brazo que contiene un botón y un segundo brazo que contiene el ojal al que se puede unir el botón del primer brazo. El

botón de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-CD3 en un modo de realización. De forma alternativa, el botón de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-diana/antígeno en un modo de realización. El ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-CD3 en un modo de realización. De forma alternativa, el ojal de los anticuerpos multiespecíficos de la invención puede ser un brazo anti-diana/antígeno en un modo de realización. Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden genomanipular usando tecnología de cruce de inmunoglobulina (también conocida como intercambio de dominio Fab o formato CrossMab) (véase, por ejemplo, el documento WO2009/080253; Schaefer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden preparar genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodímeras de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véanse, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo del mismo, también pueden incluir un "FAb de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a CD3, así como a otro antígeno diferente (por ejemplo, una segunda molécula biológica) (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0069820).

**7. Variantes de anticuerpo**

En determinados aspectos de la divulgación, se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y a una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie celular, por ejemplo, un antígeno tumoral, tal como los anticuerpos TDB de la invención o variantes de los mismos). Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede preparar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

**a. Variantes de sustitución, inserción y deleción**

En determinados aspectos de la divulgación, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 2 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 2 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

**TABLA 2. Sustituciones aminoacídicas ejemplares y preferentes**

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- 5 1. (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
2. (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
3. (3) ácidos: Asp, Glu;
- 10 4. (4) básicos: His, Lys, Arg;
5. (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- 15 6. (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

20 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para otro estudio tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban por una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

30 Se pueden preparar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de HVR, es decir, residuos codificados por codones que experimentan una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, sometándose a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración de la afinidad por construcción y reselección de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al. ed., Human Press, Totowa, NJ, 35 (2001)). En algunos aspectos de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una colección secundaria. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los 40 residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. A menudo se seleccionan, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

45 En determinados aspectos de la divulgación, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones en una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse

al antígeno. Por ejemplo, se pueden preparar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en HVR. Dichas alteraciones pueden estar, por ejemplo, fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados aspectos de la divulgación de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoacídicas.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden dirigir para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este procedimiento se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incremente la semivida en suero del anticuerpo.

#### **b. Variantes de glucosilación**

En determinados modos de realización de la divulgación, los anticuerpos anti-CD3 de la invención (por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie celular, por ejemplo, HER2) se pueden alterar para incrementar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glucosilado. La adición o delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo anti-CD3 de la invención se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato fijado a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se fija en general por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura oligosacárida biantenarica. En algunos modos de realización se pueden preparar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización de la divulgación, se proporcionan variantes de anticuerpo anti-CD3 que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras fijadas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos hacia 5' o hacia 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia pequeñas en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosilados" o "carentes de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas de células que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Led 3 CHO carentes de fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); la solicitud de pat. de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el ejemplo 11) y líneas de células con genes inactivados, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con genes inactivados (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpos anti-CD3 con oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarío unido a la región Fc del anticuerpo está bisegmentado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana et al.); y el documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

### c. Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo anti-CD3 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 anti-HER2 biespecífico de la invención que se une a CD3 y HER2, tal como un anticuerpo TDB de la invención o una variante del mismo), generando de este modo una variante de la región Fc (véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. n.º 2012/0251531). La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo anti-CD3 anti-HER2 biespecífico que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que la convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero mantiene su capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan Fc(RIII), mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII) y Fc(RIII). La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y de ahí que carezca de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163, (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood.* 101:1045-1052, (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie *Blood.* 103, 2738-2743 (2004)). También se pueden realizar la unión al FcRn y las determinaciones de eliminación/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patentes de EE. UU. n.º 6.737.056 y 8.219.149). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581 y 8.219.149).

En determinados modos de realización, la prolina en la posición 329 de una región Fc humana natural en el anticuerpo se sustituye con glicina o arginina o un residuo de aminoácido lo suficientemente grande como para destruir el sándwich de prolina dentro de la interfase del receptor Fc/Fc.γ. que se forma entre la prolina 329 de la Fc y los residuos de triptófano Trp87 y Trp110 de FcγRIII (Sondermann et al., *Nature* 406, 267-273 (20 Jul. 2000)). En determinados modos de realización, el anticuerpo comprende al menos una sustitución aminoacídica adicional. En un modo de realización, la sustitución aminoacídica adicional es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S y, en todavía otro modo de realización, la al menos una sustitución aminoacídica adicional es L234A y L235A de la región Fc de IgG1 humana o S228P y L235E de la región Fc de IgG4 humana (véase, por ejemplo, el documento US 2012/0251531) y, en todavía otro modo de realización, la al menos una sustitución aminoacídica adicional es L234A y L235A y P329G de la región Fc de IgG1 humana.

Se describen determinadas variantes de anticuerpos con una unión a FcR mejorada o disminuida. (Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

5 En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

10 En algunos modos de realización, se realizan alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

15 Los anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, 20 la sustitución del residuo de la región Fc 434 (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véanse también Duncan y Winter, Nature 322:738-40 (1988); patente de EE. UU. n.º 5.648.260; patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y documento WO 94/29351 en relación con otros ejemplos de variantes de la región Fc.

25 En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD3 biespecífico comprende una región Fc que comprende una mutación N297G. En algunos modos de realización de la divulgación, el anticuerpo anti-CD3 que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-CD3 que comprende un primer dominio de unión que comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (b) una HVR-H2 que 30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y un brazo anti-HER2 que comprende un segundo dominio de 35 unión que comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169; (b) una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170; (c) una HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171; (d) una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172; (e) una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173; y (f) una HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174.

40 Además, el anticuerpo anti-CD3 que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-CD3 que comprende un primer dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185, y un brazo anti-HER2 que comprende un segundo dominio 45 de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 270 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271.

50 En algunos modos de realización, el anticuerpo anti-CD3 que comprende la mutación N297G comprende uno o más dominios constantes de la cadena pesada, en el que el uno o más dominios constantes de la cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH1 (CH1<sub>1</sub>), un primer dominio CH2 (CH2<sub>1</sub>), un primer dominio CH3 (CH3<sub>1</sub>), un segundo dominio CH1 (CH1<sub>2</sub>), un segundo dominio CH2 (CH2<sub>2</sub>) y un segundo dominio CH3 (CH3<sub>2</sub>). En algunos casos, al menos uno de los uno o más dominios constantes de la cadena pesada está emparejado con otro dominio constante de la cadena pesada. En algunos casos, los dominios CH3<sub>1</sub> y CH3<sub>2</sub> comprenden cada uno una 55 protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o cavidad en el dominio CH3<sub>1</sub> se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH3<sub>2</sub>. En algunos casos, los dominios CH3<sub>1</sub> y CH3<sub>2</sub> se encuentran en una interfase entre dichas protuberancia y cavidad. En algunos casos, los dominios CH2<sub>1</sub> y CH2<sub>2</sub> comprenden cada uno una protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o cavidad en el dominio CH2<sub>1</sub> se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH2<sub>2</sub>. En otros casos, los dominios CH2<sub>1</sub> y CH2<sub>2</sub> se encuentran en una interfase entre dichas protuberancia y cavidad. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG1.

65 En otros modos de realización, el anticuerpo anti-CD3 que comprende la mutación N297G comprende un brazo anti-CD3 que comprende un primer dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un

95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185, así como las siguientes seis HVR: (i) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (ii) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (iii) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (iv) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (v) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (vi) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y un brazo anti-HER2 que comprende un segundo dominio de unión que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 270 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, así como las siguientes seis HVR: (i) una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169; (ii) una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170; (iii) una HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171; (iv) una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172; (v) una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173; y (vi) una HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174; en el que (a) el brazo anti-CD3 comprende mutaciones de sustitución T366S, L368A, Y407V y N297G y (b) el brazo anti-HER2 comprende mutaciones de sustitución T366W y N297G.

#### **d. Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína**

En determinados modos de realización de la divulgación, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMab", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan, de este modo, en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe además en el presente documento. En determinados modos de realización se puede sustituir con cisteína uno cualquiera o más de los siguientes residuos: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

#### **e. Derivados de anticuerpo**

En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se une a CD3 y HER2, tal como un anticuerpo TDB de la invención proporcionado en el presente documento se puede modificar además para que contenga restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar y, si se fija más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar selectivamente por exposición a radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura a la que las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico se destruyen.

#### **8. Procedimientos y composiciones recombinantes**

Los anticuerpos anti-CD3 de la invención que se unen a CD3 y HER2, tales como anticuerpos TDB de la invención se pueden producir usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD3 descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de realización se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo,

una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfática (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-CD3, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-CD3, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.os 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adapten para cultivarse en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293, como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (linfocitos TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); linfocitos TR1, como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

### C. Ensayos

Los anticuerpos anti-CD3 de la invención que se unen a CD3 y HER2, tales como anticuerpos TDB de la invención o variantes de los mismos se pueden identificar, cribar o caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

#### 1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD3 de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunolectrotransferencia, etc.

5 En otro aspecto de la divulgación, se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-CD3 de la invención por su unión a CD3.

10 En un ensayo de competencia ejemplar, se incubaba CD3 inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a CD3 y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por su unión a CD3. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control se incubaba CD3 inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones propicias para la unión del primer anticuerpo a CD3, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con CD3 inmovilizada. Si la cantidad de marcador asociado con CD3 inmovilizada se reduce sustancialmente en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a CD3. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

## 20 **2. Ensayos de actividad**

En un aspecto de la divulgación se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-CD3 de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión a un polipéptido CD3 (por ejemplo, CD3 en la superficie de un linfocito T), o un fragmento peptídico del mismo, *in vivo*, *in vitro* o bien *ex vivo*. En el caso de un anticuerpo anti-CD3 multiespecífico (por ejemplo, biespecífico) de la invención (por ejemplo, un anticuerpo TDB que tiene un brazo anti-CD3 y un brazo que reconoce una segunda molécula biológica, por ejemplo, un antígeno de superficie celular, por ejemplo, un antígeno tumoral), la actividad biológica también puede incluir, por ejemplo, activación de células efectoras (por ejemplo, activación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+)), expansión de la población de células efectoras (es decir, un incremento en el recuento de linfocitos T), reducción de la población de células diana (es decir, una disminución en la población de células que expresan la segunda molécula biológica en sus superficies celulares) y/o destrucción de células dianas. Se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*. En determinados modos de realización, se somete a prueba un anticuerpo de la invención para determinar dicha actividad biológica como se describe en detalle en los ejemplos del presente documento a continuación.

## 35 **D. Inmunoconjugados**

La divulgación también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo biespecífico de la invención conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal) o fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos.

45 En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un fragmento de anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, incluyendo pero sin limitarse a un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.os 5.208.020, 5.416.064, y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometilauristatina DE and DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.os 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.os 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véanse Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

55 En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3 de la invención conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, que incluye, pero sin limitarse a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

65 En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD3 de la invención conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un

átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

5 Los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-acido (tales como bis-(p-acidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), disocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

20 Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

### 25 **E. Procedimientos y composiciones para diagnóstico y detección**

En determinados modos de realización, los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y HER2, tales como los anticuerpos TDB de la invención, son útiles para detectar la presencia de CD3 en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido.

35 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto de la divulgación se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de CD3 en una muestra biológica. En determinados aspectos de la divulgación, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD3 como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-CD3 a CD3, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD3 y CD3. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*.

40 En determinados modos de realización de la divulgación, se proporcionan anticuerpos anti-CD3 marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodensos, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H y <sup>131</sup>I, fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

### 55 **F. Formulaciones farmacéuticas**

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención que se una a CD3 y HER2, tal como un anticuerpo TDB de la invención se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona;

aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas hialuronidasas activas a pH neutro solubles (SHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasas PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas SHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. n.os 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una SHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón acetato-histidina.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterápico, un agente citotóxico, un agente inhibidor del crecimiento y/o un agente antihormonal, tales como los enumerados en el presente documento anteriormente). Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son en general estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

### **G. Procedimientos y composiciones terapéuticos**

Cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y HER2, tales como los anticuerpos TDB de la invención, se pueden usar en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD3 de la invención para su uso en el tratamiento o retraso de la progresión de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer). En determinados modos de realización se proporciona un anticuerpo anti-CD3 para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD3 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD3. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En modos de realización adicionales, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de la invención se proporciona para su uso para potenciar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno de proliferación celular. En determinados modos de realización, se proporciona el anticuerpo anti-CD3 para su uso en un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD3 para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células dianas (por ejemplo, una célula que expresa HER2 reconocida por el anticuerpo TDB biespecífico de la invención) y/o destruir una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral diana). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD3 en la fabricación o preparación de un medicamento. En un aspecto de la divulgación, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer). En otro modo de realización de la divulgación, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno proliferativo celular, que comprende administrar a un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular una cantidad eficaz del medicamento. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otro modo de realización de la divulgación,

el medicamento es para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células dianas (por ejemplo, una célula que expresa una segunda molécula biológica reconocida por anticuerpo anti-CD3 de la invención, tal como un anticuerpo TDB biespecífico de la invención) y/o destruir una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral diana) en el individuo. En otro modo de realización de la divulgación, el medicamento es para su uso en un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (incrementar) una población de células efectoras, reducir una población de células dianas (por ejemplo, una célula que expresa HER2 reconocida por anticuerpo anti-CD3 biespecífico de la invención, tal como un anticuerpo TDB contra FcRH5 de la invención) y/o destruir una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral diana). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer). En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad o trastorno una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD3. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular. En un modo de realización de la divulgación, el procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD3 para activar células efectoras (por ejemplo, linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CD8+ y/o CD4+), expandir (incrementar) una célula efectora población de células, reducir una población de células diana (por ejemplo, una célula que expresa HER2 reconocida por un anticuerpo biespecífico anti-CD3 de la invención) y/o destruir una célula diana (por ejemplo, una célula tumoral diana). En un modo de realización de la divulgación, un "individuo" es un ser humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar un cáncer hematológico, tal como un cáncer de linfocitos B (por ejemplo, linfoma de linfocitos B maduros) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo TDB biespecífico anti-CD3 de la invención, tal como un TDB frente a HER2 que tiene un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2. En otro aspecto de la divulgación, el linfoma de linfocitos B maduros es un linfoma no hodgkiniano (NHL). En otro aspecto de la divulgación, el NHL se selecciona del grupo que comprende: DLBCL similar a linfocitos B del centro germinal (GCB), DLBCL similar a linfocitos B activadas (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células pilosas, linfoma/leucemia esplénica, inclasificable, linfoma esplénico de linfocitos B pequeños de pulpa roja difusa, variante de leucemia de células pilosas, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de la cadena pesada, enfermedad de la cadena pesada  $\alpha$ , enfermedad de la cadena pesada  $\gamma$ , enfermedad de la cadena pesada  $\mu$ , mieloma de células plasmáticas, Plasmacitoma solitario de hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma extraganglionar de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT), linfoma ganglionar de la zona marginal, linfoma pediátrico de la zona marginal ganglionar, linfoma folicular pediátrico, linfoma cutáneo primario del centro del folículo, linfoma de linfocitos B grandes rico en linfocitos T/histiocitos, DLBCL primario del SNC, DLBCL cutáneo primario, tipo de pierna, DLBCL positivo para EBV en ancianos, DLBCL asociado con inflamación crónica, granulomatosis linfomatoide, linfoma primario mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes positivo para ALK, linfoma plasmablastico, linfoma de linfocitos B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de derrame primario: Linfoma de linfocitos B, inclasificable, con rasgos característicos intermedios entre el linfoma difuso de linfocitos B grandes y el linfoma de Burkitt, y linfoma de linfocitos B, inclasificable, con rasgos característicos intermedios entre el linfoma difuso de linfocitos B grandes y el linfoma hodgkiniano clásico. En un modo de realización preferente de la invención, el procedimiento comprende tratar un cáncer que comprende DLBCL similar a linfocitos B del centro germinal (GCB), DLBCL similar a linfocitos B activadas (ABC), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoide crónica (CLL), linfoma de zona marginal (MZL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), linfoma linfoplasmocítico (LL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), linfoma del sistema nervioso central (CNSL), o linfoma de Burkitt (BL).

En otro aspecto de la divulgación, el tratamiento adicional comprende un agente alquilante. En un modo de realización, el agente alquilante es ácido 4-[5-[bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbenzimidazol-2-il]butanoico y sales del mismo. En un modo de realización, el agente alquilante es bendamustina.

En otro aspecto de la divulgación, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de BCL-2. En un modo de realización, el inhibidor de BCL-2 es 4-(4-[[2-(4-clorofenil)-4,4-dimethylcyclohex-1-en-1-yl]methyl]piperacin-1-il)-N-([3-nitro-4-[(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl]amino]phenyl)sulfonil)-2-(1H-pirrolol[2,3-b]piridin-5-

iloxi)benzamida y sales de la misma. En un modo de realización, el inhibidor de BCL-2 es venetoclax (n.º de CAS: 1257044-40-8).

En otro aspecto de la divulgación, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de la fosfoinositida 3-cinasa (PI3K). En un modo de realización, el inhibidor de PI3K inhibe la isoforma delta PI3K (es decir, P110δ). En algunos aspectos de la divulgación, el inhibidor de PI3K es 5-fluoro-3-fenil-2-[(1S)-1-(7H-purin-6-ilamino)propil]-4(3H)-quinazolinona y sales de la misma. En algunos casos, el inhibidor de PI3K es idelalisib (n.º CAS: 870281-82-6). En un modo de realización, el inhibidor de PI3K inhibe las isoformas alfa y delta de PI3K. En algunos casos, el inhibidor de PI3K es 2-{3-[2-(1-Isopropyl-3-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5,6-dihydrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2-metilpropanamida y sales de la misma.

En otro aspecto de la divulgación, el tratamiento adicional comprende un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTK). En un caso, el inhibidor de BTK es 1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona y sales de la misma. En un caso, el inhibidor de BTK es ibrutinib (CAS: 936563-96-1).

En otro aspecto de la divulgación, el tratamiento adicional comprende talidomida o un derivado de la misma. En un caso, la talidomida o un derivado de la misma es (RS)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)piperidin-2,6-diona y sales de la misma. En un caso, la talidomida o un derivado de la misma es lenalidomida (n.º CAS: 191732-72-6).

En otro aspecto de la divulgación, el tratamiento adicional comprende una o más de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina o prednisolona (CHOP). Cualquiera de los procedimientos y tratamientos anteriores se puede usar, sin limitación, para cualquier cáncer, incluyendo, por ejemplo, el tratamiento de un cáncer positivo para HER2.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico de la invención para su uso en un procedimiento para tratar cáncer positivo para HER2. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicho cáncer una cantidad eficaz de un anticuerpo TDB biespecífico anti-HER2 con un brazo dirigido a anti-HER2 y un brazo dirigido a anti-CD3. El TDB frente a HER2 posee un perfil de toxicidad aceptable cuando se administra en una dosis eficaz en un paciente. En un modo de realización, el brazo frente a CD3 de TDB frente a HER2 con un perfil de toxicidad aceptable es un brazo frente a CD3 de baja afinidad. En un modo de realización, el brazo frente a CD3 de TDB frente a HER2 con un perfil de toxicidad aceptable es 40G5c.

En un modo de realización preferente, el cáncer positivo para HER2 es un cáncer de mama positivo para HER2 o un cáncer gástrico positivo para HER2. En un modo de realización, se coadministra TDB frente a HER2 con uno o más agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a la vía de HER. En un modo de realización, el agente terapéutico que se dirige a la vía de HER se selecciona de un inhibidor de EGFR, un inhibidor de HER2, un inhibidor de HER3 y/o un inhibidor de HER4. En un modo de realización, se coadministra TDB frente a HER2 con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de trastuzumab (Herceptin®), T-DM1 (Kadcyla®) y pertuzumab (Perjeta®). En un modo de realización, se coadministra un TDB frente a HER2 con trastuzumab. En un modo de realización, se coadministra un TDB frente a HER2 con T-DM1. En un modo de realización, se coadministra un TDB frente a HER2 con pertuzumab. En un modo de realización, se coadministra un TDB frente a HER2 con trastuzumab y pertuzumab. En un modo de realización, se coadministra un TDB frente a HER2 con T-DM1 y pertuzumab.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD3 de la invención y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación en el presente documento.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar un anticuerpo de la invención con al menos un agente terapéutico adicional. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente quimioterápico, agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico, agente usado en radioterapia, agente antiangiogénesis, agente apoptótico, agente antitubulina u otro agente, tal como un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina cinasa), inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferón, citocina, anticuerpo distinto del anticuerpo anti-CD3 de la descripción, tal como un anticuerpo que se une a una o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF o receptor(es) de VEGF, TRAIL/Apo2, PD-1, PD-L1, PD-L2, u otro agente químico bioactivo u orgánico.

En algunos modos de realización, la invención proporciona el uso en un procedimiento en el que el agente terapéutico adicional es un glucocorticoide. En un modo de realización, el glucocorticoide es dexametasona.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, caso en el que la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes de, simultáneamente a y/o después de la administración del agente o agentes terapéutico(s) adicional(es). En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-CD3 y la administración de un agente terapéutico adicional se producen en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí. Los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención (es decir, anticuerpos anti-CD3 biespecíficos de la invención que se unen a CD3 y HER2, tales como un anticuerpo TDB de la invención o variante del mismo) también se pueden usar en combinación con radioterapia.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunos casos, el anticuerpo se administra por vía subcutánea. En algunos casos, un anticuerpo anti-CD3 administrado mediante inyección subcutánea presenta una respuesta menos tóxica en un paciente que el mismo anticuerpo anti-CD3 administrado mediante inyección intravenosa. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas incluyendo pero sin limitarse a administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración por inyección intravenosa rápida e infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de forma consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular al que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. No es necesario, pero el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para evitar o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si se administra el anticuerpo con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, anamnesis del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos.

Como una propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD3 administrada a un ser humano estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea mediante una o más administraciones. En algunos modos de realización, el anticuerpo usado es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg administrados diariamente, por ejemplo. En un modo de realización, un anticuerpo anti-CD3 descrito en el presente documento se administra a un ser humano a una dosis de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg o aproximadamente 1400 mg el día 1 de ciclos de 21 días. La dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo anti-CD3). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. El curso de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

En algunos aspectos, los procedimientos pueden comprender además un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser radioterapia, cirugía, quimioterapia, tratamiento génico, tratamiento con ADN, tratamiento vírico, tratamiento con ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, tratamiento con anticuerpos monoclonales o una combinación de los anteriores. El tratamiento adicional puede ser en forma de tratamiento adyuvante o neoadyuvante. En algunos casos, el tratamiento adicional es la administración de inhibidor enzimático de molécula pequeña o agente antimetastático. En algunos casos, el tratamiento adicional es la administración de agentes limitantes de efectos secundarios (por ejemplo, agentes destinados a disminuir la aparición y/o la gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes antieméticos, etc.). En algunos casos, el tratamiento adicional es radioterapia. En algunos casos, el tratamiento adicional es cirugía. En algunos casos, el tratamiento adicional es irradiación gamma. En algunos casos, el tratamiento adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes terapéuticos descritos anteriormente.

#### **H. Artículos de fabricación**

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

#### **III. Ejemplos**

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

#### **Ejemplo 1. Generación de anticuerpos anti-CD3**

##### **Antígenos CD3 $\epsilon$**

##### **A. CD3 $\epsilon$ + CD3 $\gamma$ biespecífico humano y de macaco cangrejero fusionado a IgG2a-Fc de ratón (CD3 $\epsilon\gamma$ -muFc)**

El ADNc que codifica porciones extracelulares de CD3 $\epsilon$  o CD3 $\gamma$  humano o de macaco cangrejero se fusionó en el extremo C terminal a un Fc de IgG2a de ratón para generar fusiones CD3-Fc. Los ADNc que codifican dominios extracelulares de CD3 $\epsilon$  y CD3 $\gamma$  humanos o de macaco cangrejero se generaron usando ARN total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas anti-CD3/anti-CD28. Las PBMC normales se activaron mediante anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados en placa en RPMI suplementado con FBS al 10% durante 72 h. El ARNm total se aisló usando un mini kit RNeasy de Qiagen. El ADNc se clonó usando cebadores específicos de genes mediante RT-PCR en vectores TOPO usando productos de PCR amplificados con Taq polimerasa siguiendo el protocolo proporcionado con el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen. Los fragmentos resultantes se introdujeron en un vector de expresión de mamífero que contenía un dominio Fc de IgG2a murino mediante subclonación sin restricciones usando ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (New England Biolabs, n.º de catálogo M0530L). Los fragmentos de CD3 se amplificaron así con regiones superpuestas contenidas en el plásmido plantilla para orientarlas directamente aguas abajo de la secuencia señal y N-terminal con respecto al Fc murino.

Tanto para construcciones humanas como de macaco cangrejero, el plásmido que contiene CD3 $\epsilon$ -Fc se coexpresó transitoriamente con el plásmido que contiene CD3 $\gamma$ -Fc en células CHO de mamífero. Los heterodímeros de CD3 $\epsilon\gamma$  se purificaron mediante proteína A-Sepharose (Pharmacia Biotech).

##### **B. Conjugados péptido N-terminal-KLH (CD3 $\epsilon$ -KLH)**

Se sintetizaron fragmentos peptídicos que contenían secuencias N-terminales de CD3ε de macaco cangrejero y humano. Los fragmentos destinados a la inmunización se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH), una proteína portadora ampliamente usada para generar una respuesta inmune sustancial. Agregar la cisteína natural en la posición 28 para CD3ε macaco cangrejero y humano permitió el acoplamiento de KLH activado por maleimida a la cisteína C-terminal que contiene tiol.

**C. CD3ε-26mer-CD3γ (CD3εγ) monocatenario**

Los ADNc que codifican porciones extracelulares de las subunidades CD3ε y CD3γ humanas se generaron mediante PCR. Los aminoácidos 1-97 de CD3ε humano y los aminoácidos 1-81 de CD3γ humano se conectaron usando un conector peptídico flexible de 26 aminoácidos para formar una construcción CD3ε-26mer-CD3γ (CD3εγ) (figura 1). La construcción se clonó en un vector de expresión con una etiqueta His para la secreción de *E. coli* usando el promotor de la fosfotasa alcalina y la secuencia señal de secreción STIII. CD3εγ se purificó en una columna de Ni y posteriormente se volvió a plegar. A continuación se purificó CD3εγ correctamente plegado usando una columna de afinidad OKT3.

Además, para algunos experimentos de unión, se adquirió CD3ε comercial de Creative Biomart, Shirley, Nueva York 11967 (número de catálogo CD3E-2194H).

**20 Inmunizaciones**

**A. Inmunizaciones de ratón**

Se inmunizaron ratones BALB/c o C57BL/6 (2 µg o 10 µg/inyección por ratón). Se inyectaron antígenos, suspendidos en adyuvante de monofosforil lípido A/dicorinomicolato de trehalosa, en la almohadilla plantar a intervalos de 3 a 4 días para un total de 12 a 15 refuerzos. Tres días después del refuerzo final previo a la fusión, se recolectaron linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de ratones inmunizados. Se fusionaron linfocitos de ratón aislados con células de mieloma SP2/0-Ag14 (Colección Americana de Cultivos Tipo) usando el aparato Cyto Pulse CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences). Brevemente, después de lavar dos veces con Cytofusion Medium C (n.º de cat. LCM-C), las células del bazo aisladas y las células SP2/0-Ag14 se mezclaron en una proporción de 1:1 y a continuación se suspendieron a 10 millones de células/ml en Cytofusion Medium C. La electrofusión se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fusionadas se cultivaron en medio C ClonaCell-HY (n.º de cat. 03803) durante la noche a 37 °C en una estufa de incubación con un 7 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las células fusionadas se centrifugaron y a continuación se suspendieron en 10 ml de medio ClonaCell-HY C y a continuación se mezclaron suavemente con 90 ml de medio ClonaCell-HY D a base de metilcelulosa (n.º de cat. 03804) que contenía componentes HAT. Las células se sembraron en placa en placas de OmniTray (Thermo Scientific) y se dejó que crecieran a 37 °C en una estufa de incubación con un 7 % de CO<sub>2</sub>. Después de 6 a 7 días de incubación, ClonePix FL (Molecular Devices) recogió clones de hibridoma individuales y los transfirió a placas de cultivo celular de 96 pocillos (n.º 353075, Becton Dickinson) con 200 µl/pocillo de medio ClonaCell-HY E (n.º de cat. 03805). Los medios de cultivo de hibridoma se cambiaron antes del cribado por ELISA.

**8. Inmunizaciones de conejo**

Las inmunizaciones en conejos se realizaron usando 0,5 mg/inyección de CFA/IFA humano y de macaco cangrejero CD3ε-KLH cada 2 semanas durante 5 inyecciones (d0, d14, d28, d42, d56). Los sangrados se realizaron los días 52 y 66.

Las fusiones de PEG y el cribado se realizaron de la siguiente manera. Se cribaron los clones para determinar su unión a la porción N-terminal de CD3ε conjugada con tiroglobulina (THY) mediante ELISA. También se encontró que todos los clones positivos presentaban reacción cruzada con CD3ε de macaco cangrejero mediante ELISA y se seleccionaron 16 clones únicos para la subclonación. El ARN total se extrajo de sedimentos celulares congelados y se purificó usando un kit Qiagen RNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se sintetizó usando RT-PCR de una sola etapa (Qiagen). Los dominios VH y VL de conejo se amplificaron adicionalmente por PCR usando un protocolo descrito para generar colecciones inmunes de conejo (Kontermann y Dubel. Ingeniería de anticuerpos. 1: 115-123, 2010). La degeneración moderada se diseñó para representar genes comunes de inmunoglobulina de la línea germinal de conejo.

**Cribado de anticuerpos.**

**A. Cribado de hibridoma de ratón**

3 días después del cambio de medio, los sobrenadantes de hibridoma se cribaron mediante ELISA para determinar la unión tanto a CD3ε humano como CD3ε de macaco cangrejero, como se describe a continuación. Todos los clones positivos para ELISA se cribaron adicionalmente mediante citometría de flujo para determinar su unión a linfocitos T Jurkat humanos, PBMC humanas y PBMC de macaco cangrejero (figuras 2 y 3). Los sobrenadantes de hibridoma se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A, a continuación filtración estéril (tamaño

de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , Nalge Nunc International, NY, USA) y almacenamiento a 4 °C en PBS. Los mAb purificados se confirmaron mediante ELISA antes de realizar más pruebas en ensayos funcionales. El isotipo de mAb se determinó usando un kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón de Roche Diagnostics Corporation.

- 5 Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos anti-CD3 13A3, 72H6 y 19B1 se muestran en la figura 4A. La figura 4A también delimita las secuencias HVR para cada uno de los tres anticuerpos. Las figuras 4B, 4C, 5A y 5B muestran secuencias de aminoácidos adicionales de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de otros anticuerpos anti-CD3.

## 10 **8. Cribado tras la inmunización de conejos**

Se clonaron ocho secuencias únicas de la cadena pesada y seis secuencias únicas de la cadena ligera a partir de líneas celulares de hibridoma. La figura 7 muestra las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de uno de estos anticuerpos, Rab17. La gran similitud en la secuencia llevó a la decisión de centrarse en 6 pares pesados y ligeros. Los 6 anticuerpos resultantes se expresaron como IgG quiméricas de conejo/humano a pequeña escala (cultivos de 100 ml de 293S) y se cribaron para determinar su unión a CD3 épsilon mediante ELISA.

### **Caracterización de anticuerpos: ensayos de afinidad de unión y actividad de activación de linfocitos T**

#### 20 **A. Ensayo ELISA de unión a CD3 $\epsilon\gamma$**

El ensayo ELISA de unión a CD3 $\epsilon\gamma$  se realizó en placas ELISA de microvaloración de 96 pocillos (Greiner, Alemania) recubiertas con aminoácidos N-terminales de CD3 $\epsilon$  humano/macaco cangrejero conjugados con THY o CD3 $\epsilon\gamma$  humano/de macaco cangrejero fusionados con Fc murino a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6), 25 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con tampón de lavado (TWEEN® 20 al 0,05 % en PBS, Sigma), las placas se bloquearon con 200  $\mu\text{l}$  de diluyentes de ensayo ELISA con BSA. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes cultivados o anticuerpos monoclonales (mAb) purificados diluidos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces y se incubaron con anti-Fc de IgG de ratón caprino conjugado con HRP durante 1 h. Después de lavar tres veces, se detectó la enzima unida por adición de 30 100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  del sustrato TMB (BioFX Laboratories, MD, EE.UU.) durante 5 min. Las reacciones se detuvieron añadiendo 100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  de reactivo de detención (BioFX Laboratories, MD, USA) y detección del color a  $A_{630 \text{ nm}}$ .

#### **8. Análisis de citometría de flujo**

35 Los linfocitos T Jurkat humanos, las PBMC humanas o las PBMC de macaco cangrejero se lavaron dos veces con tampón de tinción de FACS (solución salina tamponada con fosfato que contiene suero bovino fetal al 1%) y a continuación se suspendieron en tampón de tinción de FACS hasta una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de células a una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con fondo en U (#353077, Becton Dickinson) y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes de hibridoma o mAb purificados diluidos. Después de 40 minutos de incubación en hielo, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción de FACS y posteriormente se tiñeron con anticuerpo anti-IgG de ratón caprino conjugado con FITC o alofococianina (APC) (n.º 1012-11, Southern Biotech) a una dilución 1:300 durante 30 mín. Después de lavar dos veces con tampón de tinción de FACS, las células se analizaron mediante citometría de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron usando el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc.).

45

#### **C. Ensayo de activación de linfocitos T humanos**

Se extrajo sangre humana en jeringuillas heparinizadas y las PBMC se aislaron usando Leucosep (Greiner Bio-one, n.º de cat. 227290P) y Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, n.º de cat. 95038-168), como se recomienda por el fabricante. Las células se lavaron en medio RPMI que contenía FBS al 10 %, complementado con GlutaMax (Gibco, n.º de cat. 35050-061), penicilina y estreptomina (Gibco, n.º de cat. 15140-122), y se añadieron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa de fondo en U de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-CD3 entre 10 y 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Después de su cultivo durante ~20 horas, se lavaron las células con tampón de FACS (BSA al 0,5 %, acida de Na al 0,05 % en PBS). A continuación, las células se tiñeron con anti-CD69-FITC (BD, n.º de cat. 555530), anti-CD25-PE (BD, n.º de cat. 555432), anti-CD4-APC (BD, n.º de cat. 555349) o anti-CD8-APC (BD, cat#555369) en tampón de FACS, se lavaron con tampón de FACS y se suspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de tampón de FACS que contenía 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de yoduro de propidio. Se obtuvieron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron usando FlowJo. El grado de activación de los linfocitos T se determinó comparando el porcentaje de población CD69+ y CD25+ en linfocitos T CD4+ o CD8+.

60

#### **D. Ensayo de activación de linfocitos T de macaco cangrejero**

La sangre de macaco cangrejero se recogió en tubos heparinizados. Los glóbulos rojos se lisaron dos veces con tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (NH<sub>4</sub>Cl al 0,874%, KHCO<sub>3</sub> al 0,1%, EDTA disódico al 0,00368). Las células se lavaron en medio RPMI que contenía FBS al 10 %, complementado con GlutaMax (Gibco, n.º de cat. 35050-061), penicilina y estreptomina (Gibco, n.º de cat. 15140-122), y se añadieron ~0,2 millones de células

65

suspendidas a una placa de fondo en U de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-CD3 a 10 µg/ml. Después de su cultivo durante ~20 horas, se lavaron las células con tampón de FACS (BSA al 0,5 %, acida de Na al 0,05 % en PBS). A continuación, las células se tiñeron con anti-CD69-FITC (BD, n.º de cat. 555530), anti-CD25-PE (BD, n.º de cat. 555432) y anti-CD4-APC (BD, n.º de cat. 551980) en tampón de FACS, se lavaron con tampón de FACS y se suspendieron en 100 µg de tampón de FACS que contenía 1 µg/ml de yoduro de propidio. Se obtuvieron los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron usando FlowJo. El grado de activación de los linfocitos T se determinó comparando el porcentaje de población CD69+ y CD25+ en los linfocitos T CD4+.

## Generación de variantes de anticuerpos anti-CD3

### A. Clonación y secuenciación de hibridomas de reactividad cruzada de ratón CD3εy humano/ de macaco cangrejero

El ARN total se extrajo de células de hibridoma de ratón con el kit RNeasy (Qiagen) y se sintetizó el ADNc de la primera cadena usando un kit SuperScript III RT (Invitrogen). Los genes de los anticuerpos se amplificaron mediante PCR de Taq polimerasa a prueba de errores con una mezcla de cebadores degenerados en 5' y cebadores específicos de Cy, Cx y Cλ en 3'. Los productos de la PCR se purificaron y las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se obtuvieron secuenciando el producto de la PCR. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se digirieron con enzimas de restricción apropiadas y se clonaron en los respectivos vectores de expresión pRK. Los anticuerpos murinos se expresaron en 293 células.

### 8. Humanización

Las secuencias de hibridomas de reactividad cruzada de CD3εy humano/de macaco cangrejero se alinearon con los dominios variables ligeros y pesados de la línea germinal o consenso humano más homólogos (figura 7). Se derivó una secuencia consenso denominada mu40G5c a partir de dominios variables de la cadena ligera y pesada de clones de hibridoma relacionados (figura 7). Se diseñaron regiones hipervariables (HVR) en estructuras aceptoras humanas ligeras y pesadas para generar injertos de CDR humanizados (véase, por ejemplo, figuras 8A-8F). Las variantes humanizadas se evaluaron en forma de fragmentos Fab o como IgG. Se usaron las posiciones del dominio VL 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) y las posiciones del dominio VH 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) para los injertos (figuras 8A-8F). También se generaron variantes adicionales que incluían diversas combinaciones de una o más posiciones de nonio de ratón y se sometieron a prueba para determinar la afinidad de unión (véanse, por ejemplo, las figuras 9A-9F). Residuos de dominio variable murino en posiciones de nonio selectos se incorporaron en una secuencia humanizada final en base a su capacidad para mejorar la afinidad de unión. Las afinidades de unión monovalente para anticuerpos humanizados seleccionados para diferentes antígenos CD3ε se muestran en la figura 10. Las afinidades de unión para las variantes de afinidad del anticuerpo anti-CD3 humanizado 38E4 (38E4v1-38E4v9) y 40G5c se muestran en la figura 11.

### C. Mapeo de paratopos

Cada residuo en HVR-L3 y HVR-H3 de hu38E4 se mutó por separado a alanina usando mutagénesis Kunkle. Además, la posición 95 en HVR-H3 también se mutó a serina, treonina o glutamato. Las variantes con estas mutaciones puntuales se expresaron como Fabs en células HEK293 y se cribaron inicialmente con un procedimiento cinético de ciclo único en un Biacore T100. Las variantes seleccionadas también se ampliaron y purificaron para un procedimiento cinético de ciclos múltiples convencional. Para la cinética de ciclo único, se inmovilizaron chips sensores Biacore Series S CM5 con anticuerpos anti-Fab humanos (kit de captura de Fab humano, GE Healthcare). Cada Fab se capturó del sobrenadante del cultivo y las concentraciones crecientes (que van desde 3 nM a 250 nM en tampón HBSP) de CD3εy humano se inyectaron secuencialmente a un caudal de 30 µl/min en un único ciclo de análisis sin regeneración de la superficie entre inyecciones; se adquirieron 10 min de disociación para cada ciclo. Para la cinética de ciclos múltiples convencional, se inmovilizaron CD3εy humanos, CD3εy de macaco cangrejero o un péptido de 27 unidades en un chip sensor Biacore Series S CM5 usando el kit de acoplamiento de aminas de Biacore. Se inyectaron diluciones seriadas triples de cada variante de Fab a un caudal de 30 µl/min. Cada muestra fue analizada con un protocolo de asociación de 3 minutos y disociación de 3 minutos. En ambos procedimientos, los chips Biacore se regeneraron usando glicina 10 mM (pH 1,7). La respuesta de unión se corrigió mediante resta en blanco y se usó un modelo Langmuir 1:1 de ajuste simultáneo de  $k_{as}$  y  $k_{dis}$  para el análisis cinético. Los efectos de estas mutaciones, resumidos en la figura 12, indican que el residuo de la cadena ligera R96 y los residuos de la cadena pesada Y97, R99 y F100b desempeñan funciones críticas en la unión a CD3εy.

### D. Mapeo de epítomos CD3

Se introdujeron mutaciones de alanina en CD3ε<sup>1-27</sup>-Fc para evaluar el reconocimiento de epítomos de anticuerpos anti-CD3ε de unión N-terminal. Cada variante de CD3ε<sup>1-27</sup>- Fc se inmovilizó en placas Nunc Maxisorp durante la noche en PBS a 2 µg/ml a 4°C. Después de bloquear las placas con leche en polvo al 2 % en PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % durante 1 h, se añadieron 100 µl de anti-CD3ε 3 nM a cada pocillo y se dejó que se unieran durante 1 h a 25 °C. Después de 6 lavados con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, se detectó la unión de

anticuerpo mediante la adición de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-HRP, como se representa en la figura 13A.

5 Se subclonó CD3 $\epsilon$  en un fagémido M13 que contiene una marca gD C-terminal seguida de un codón de parada de color ámbar para que se pueda mostrar en el fago o expresarse en una cepa no supresora de *E. coli*. Este fagémido CD3 $\epsilon$  se usó como molde para realizar mutaciones de alanina únicas en CD3 $\epsilon$  mediante mutagénesis de Kunkel. Cada mutante de alanina CD3 $\epsilon$  presentado en el fago se confirmó mediante secuenciación de ADN, se aisló de una sola colonia, se cultivó durante la noche en fago auxiliar 2YT/Carb más KO7 y se purificó mediante precipitación con PEG. El efecto de la mutación de alanina en CD3 $\epsilon$  sobre la unión del anticuerpo anti-CD3 se evaluó mediante un ELISA de fagos. Cada anticuerpo anti-CD3 se inmovilizó en una placa NUNC maxisorp a 2  $\mu$ g/ml en tampón PBS durante la noche a 4°C. Sobrenadante de fago purificado que muestra una variante de alanina CD3 $\epsilon$  (1,0 OD<sub>450</sub>) se añadió a la placa y se dejó que se uniera a temperatura ambiente con agitación durante 1 h. Después del lavado, se detectó el fago unido con anti-M13-HRP (GE Healthcare n.º de cat. 45-001-419). La unión de cada variante de alanina CD3 $\epsilon$  se comparó con la unión del fago CD3 $\epsilon$  natural (figura 13B). 15 Las variantes de alanina que afectaban la unión del anticuerpo anti-CD3 se caracterizaron además mediante la evaluación de la unión como una función de la concentración de fagos (figura 13C).

Para cuantificar el impacto de las mutaciones de alanina en CD3 sobre la unión de anticuerpos, se expresaron mutantes de alanina de CD3 seleccionados en una cepa no supresora de *E. coli*. Las variantes de CD3 $\epsilon$  secretadas se capturaron de la fracción periplásmica bruta usando el anticuerpo anti-CD3 UCHT1v9. UCHT1v9 se inmovilizó en un chip CM5 serie S mediante acoplamiento de amina usando el kit de captura de anticuerpos anti-IgG (Fc) humana (BR-1008-39) de GE Healthcare. Las mediciones de SPR se realizaron en el instrumento Biacore 4000, utilizando un programa informático de evaluación cinética. Para medir las afinidades de unión monovalente, se usaron anticuerpos biespecíficos anti-CD3 en los que un brazo era el anti-CD3 que se iba a someter a prueba y el brazo reconocía un antígeno irrelevante. Los anticuerpos anti-CD3 biespecíficos se pasaron sobre el sobrenadante capturado en una serie de concentraciones de diluciones dobles de 0,39 a 100 nM. La cinética resultante (figura 13D) se midió y calculó usando el programa informático de evaluación Biacore 4000 BIA (código de producto 28-9664-57).

30 **E. Mapeo estructural del sitio de unión de CD3 $\epsilon$**

**1. Fab Hu38E4.v1**

35 Se mezclaron Fab Hu38E4.v1, disuelto en NaCl 0,15 M, tris 25 mM, pH 7,5 a 10 mg/ml y un exceso molar de 2 veces (1 mg) de péptido CD3 $\epsilon$ , QDGNEEMGGITQTPYK (SEQ ID NO: 284) (figura 14A) y sometieron a pruebas de cristalización. El cribado inicial se realizó con una matriz escasa de precipitantes en un formato de difusión de vapor en forma de gota sentada. Los cristales optimizados crecieron a partir de una mezcla 1:1 con una solución de depósito que contenía 70 % v/v de metilpentanodiol y tampón HEPES 0,1 M a pH 7,5. El depósito se usó como crioprotector. Los cristales se transfirieron a temperatura criogénica mediante inmersión repentina en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción para el cocrystal del péptido Fab Hu38E4.v1 y CD3 $\epsilon$  se recogieron en la línea de haz 22ID de Advanced Photon Source, usando un detector CCD MAR300. A continuación, las difracciones registradas se integraron y ajustaron a escala usando el programa HKL2000.

45 La estructura se escalonó mediante el procedimiento de reemplazo molecular (MR) usando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR fue una subunidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido CD3 $\epsilon$  se incorporó a la estructura en base a un mapa Fo-Fc. Posteriormente, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX usando las funciones objetivo de máxima verosimilitud, el procedimiento de refinamiento del factor B individual anisotrópico y el procedimiento de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Los datos y las estadísticas de refinamiento se muestran en la Tabla 3A.

55 **TABLA 3A. Estadísticas de recopilación y refinamiento de datos para el complejo hu38E4.v1/CD3 $\epsilon$**

Grupo espacial	P3221
Celda unitaria	a=73,2Å, b=73,2Å,c=183,7Å $\alpha=90^\circ$ $\beta=120^\circ$ $c=90^\circ$
Resolución	50.0 - 1.95 Å
Número total de reflexiones	42632 (4188) <sup>1</sup>
Compleitud (%)	100 (100)

Grupo espacial	P3221
Redundancia	19,7 (8,3)
$I/\sigma$	7,1 (3,0)
$R_{sym}^2$	0,112 (0,812)
Intervalo de resolución	50 - 1,95 Å
$R_{cryst}^3/R_{free}^4$	0,152/0,185
Átomos distintos de hidrógeno	3960
Moléculas de agua	446
Promedio B, Global	21,97
Promedio B, Proteína	20,63
Promedio B, Agua	32,27
r.m.s.d. longitudes de enlace	0,009 Å
r.m.s.d. ángulos	1,258°

<sup>1</sup>Los valores entre paréntesis corresponden al nivel de resolución más alta, que es 2,02 Å - 1,95 Å.

<sup>2</sup> $R_{sym} = \sum |I_{hi} - \bar{I}_h| / \sum I_{hi}$ , donde  $I_{hi}$  es la intensidad escalada de la  $i$ -ésima observación de reflexión relacionada con la simetría  $h$  y  $\bar{I}_h$  es el valor medio.

<sup>3</sup> $R_{cryst} = \sum |F_{o,h} - F_{c,h}| / \sum F_{o,h}$ , donde  $F_{o,h}$  y  $F_{c,h}$  son las amplitudes del factor de estructura observadas y calculadas para la reflexión  $h$ .

<sup>4</sup>Valor de  $R_{free}$  se calcula para un 5% de reflejos elegidos aleatoriamente y no incluidos en el refinamiento.

- 5 La estructura cristalina del complejo peptídico Fab hu38E4.v1/CD3 $\epsilon$  se determinó con una resolución de 19 Å. La estructura reveló que el péptido CD3 $\epsilon$  hace un pequeño giro y se inserta profundamente en la hendidura entre las cadenas pesada y ligera del Fab 38E4.v1 (figuras 14B y 14C). La unión entera 666 Å<sup>2</sup> de superficie accesible al disolvente entre el péptido y el fragmento Fab e implica una red intrincada de interacciones hidrofóbicas, de unión de hidrógeno e iónicas (figura 14D). El anillo N-terminal de piroglutamato (piroglu) se empaqueta contra la cadena pesada Tyr33 y forma un enlace de hidrógeno con la cadena pesada His35 en HVR-H1. La voluminosa cadena lateral del residuo F100b en HVR-H3 empuja a His35 a una orientación adecuada para su interacción con piroglu y explica la pérdida de unión observada cuando F100b se muta a alanina, un pequeño residuo de cadena lateral.
- 10 Además, consecuente con los resultados del escaneo de alanina, R96 en CDR-L3 forma un enlace de hidrógeno crítico con el grupo carboxilo en el piroglu, mientras que Y97 en CDR-H3 forma un enlace de hidrógeno con Met7 del péptido CD3 $\epsilon$  (figura 14E). De forma interesante, si bien la sustitución de alanina en R99 en CDR-H3 tiene un efecto espectacular sobre la unión del antígeno, la estructura revela que esta cadena lateral apunta en dirección opuesta al péptido CD3 $\epsilon$  y no participa en ninguna interacción con el péptido. En cambio, R99 hace contactos extensos con varios residuos en CDR-H3, incluyendo un enlace de hidrógeno con D101 y un empaque hidrofóbico
- 15 contra Y100a que impacta aún más el residuo de nonio, LC Y49 (figura 14F). Estas interacciones probablemente sean importantes para el soporte y la disposición general de los bucles CDR en el Fab 38E4.v1 al organizar la hendidura central crítica entre las cadenas pesadas y ligeras para permitir la unión del péptido CD3 $\epsilon$ .
- 20 La figura 14G identifica todos los residuos del Fab 38E4.v1 que se determinó que residían dentro de 5 Å del péptido CD3 $\epsilon$ . Estos residuos de contacto con el antígeno son idénticos entre hu38E4.v1 y hu40G5c, excepto que el residuo G96 de hu38E4.v1 es un residuo de serina (S96) en hu40G5 (véase la figura 14H, que representa la localización del residuo de contacto G96 de hu38E4.v1).
- 25 Los contactos entre anti-CD3 (38E4.v1) y el péptido CD3 $\epsilon$  se calcularon en base al escaneo de alanina. Los epítopos reconocidos por el anti-CD3 38E4v1 son contactos con una distancia de 3,5 Angstroms o menos, como se proporciona en la Tabla 3B a continuación. A partir de este análisis, se encontró que los epítopos de CD3 Gln1 (PCA1, ácido piroglutámico), Asp2, Glu6 y Met7 eran residuos formadores de contacto importantes con los paratopos de las regiones variables de la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo CD3.
- 30

TABLA 3B. Contactos CD3 para el complejo hu38E4.v1/CD3 $\epsilon$

Cadena de anticuerpos	Residuos	nombre del átomo	Átomo	péptido CD3	Residuos	nombre del átomo	Átomo	Distancia
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	O	O	2,76
/H/	35(HIS)	NE2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	2,85*

## ES 2 986 082 T3

/L/	96(ARG)	NH1	N	/A/	1(PCA)	O	O	2,9
/L/	96(ARG)	CZ	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,24
/H/	33(TYR)	CG	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,27
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	OE	O	3,28
/H/	100(TYR)	CD1	C	/A/	1(PCA)	O	O	3,33
/H/	33(TYR)	CB	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,34
/L/	96(ARG)	NH2	N	/A/	1(PCA)	CD	C	3,35
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	OE	O	3,44
/H/	50(PRT)	CH2	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,45
/H/	33(TYR)	CD2	C	/A/	1(PCA)	CD	C	3,47
/H/	50(PRT)	CZ3	C	/A/	1(PCA)	N	N	3,48
/L/	94(LEU)	N	N	/A/	2(ASP)	OD1	O	2,71
/H/	50(PRT)	CH2	C	/A/	2(ASP)	OD1	O	3,23
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	2(ASP)	CB	C	3,44
/H/	100(TYR)	CE1	C	/A/	2(ASP)	O	O	3,48
/L/	91(SER)	O	O	/A/	3(GLY)	N	N	2,88
/L/	27(ASN)d	ND2	N	/A/	3(GLY)	O	O	2,96
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	3(GLY)	N	N	3,22
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	3(GLY)	O	O	3,3
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	32(TYR)	CE2	C	/A/	3(GLY)	O	O	3,42
/L/	91(SER)	O	O	/A/	3(GLY)	CA	C	3,49
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	4(ASN)	N	N	2,81
/L/	27(ARG)f	NH1	N	/A/	4(ASN)	O	O	3,06
/L/	92(PHE)	O	O	/A/	4(ASN)	CB	C	3,11
/L/	92(PHE)	CZ	C	/A/	4(ASN)	OD1	O	3,43
/L/	32(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	OE1	O	2,58*
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE2	O	2,74*
/L/	27(ARG)f	NH1	N	/A/	6(GLU)	O	O	2,77
/L/	27(ASN)d	ND2	N	/A/	6(GLU)	O	O	3,04
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,2
/L/	30(LYS)	CD	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,35
/L/	30(LYS)	NZ	N	/A/	6(GLU)	CD	C	3,36
/H/	100(TYR)	CE2	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,4
/H/	98(SER)	CA	C	/A/	6(GLU)	OE2	O	3,42
/H/	100(TYR)	OH	O	/A/	6(GLU)	CB	C	3,44
/L/	32(TYR)	CZ	C	/A/	6(GLU)	OE1	O	3,47
/H/	97(TYR)	OH	O	/A/	7(MET)	N	N	2,87
/L/	27(ARG)f	NE	N	/A/	7(MET)	O	O	2,95
/H/	97(TYR)	OH	O	/A/	7(MET)	CB	C	3,49

/L/	27(ARG)f	CD	C	/A/	7(MET)	O	O	3,5
-----	----------	----	---	-----	--------	---	---	-----

\*Representa enlaces de hidrógeno entre dos cadenas laterales.

Las celdas sombreadas en gris representan contactos fiables de enlaces de hidrógeno.

Los contactos en negrita son enlaces de hidrógeno formados entre las cadenas laterales y las cadenas principales.

## 2. Fab SP34v52

Se disolvió Fab SP34v52 en NaCl 0,25 M, MES 25 mM, pH 5,5 a 10 mg/ml. El cribado de cristalización inicial se realizó con una pantalla de matriz dispersa (PEGII, Qiagen) en un formato de difusión de vapor de gota sentada. Se encontró un resultado positivo de cristalización en una gota cuyo depósito contenía CaCl<sub>2</sub> 0,2 M, HEPES 0,1 M, pH 7,5 y PEG 4000 al 30 % p/v. Los cristales optimizados crecieron a partir de una mezcla de 2 µl de proteína y 2 µl de solución de depósito que contenía 20-23% p/v de PEG 3350, HEPES 0,1 M, pH 7,2, CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Se usó el procedimiento de difusión de vapor en gota colgante y la gota de cristalización final se incubó a 18 °C.

Los datos de difracción para Fab SP34v52 se recopilaron en la línea 12-2 del haz de la fuente de luz sincrotrón de Stanford, usando un detector PILATUS. A continuación las difracciones registradas se integraron usando el programa XDS y se ajustaron a escala usando el programa SCALA. La estructura se escalonó mediante el procedimiento de reemplazo molecular (MR) usando el programa Phaser. El modelo de búsqueda de MR fue una subunidad Fab derivada de una estructura cristalina del complejo HGFA/Fab (código PDB: 2R0L). El péptido CD3ε se incorporó a la estructura basada en un mapa F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>. Posteriormente, la estructura se refinó con los programas REFMAC5 y PHENIX usando las funciones objetivo de máxima verosimilitud, el procedimiento de refinamiento del factor B individual anisotrópico y el procedimiento de refinamiento TLS, para lograr la convergencia. Los datos y las estadísticas de refinamiento se muestran en la Tabla 4 a continuación.

**TABLA 4. Estadísticas de recopilación y refinamiento de datos para SP34v52**

Grupo espacial	P622
Celda unitaria	a=b=146,3Å, c=80,1Å α=90° β=90° c=120°
Resolución	50,0 - 2,50 Å
Número total de reflexiones	18004 (170) <sup>1</sup>
Complejitud (%)	100 (100)
Redundancia	19,3 (19,7)
I/σ	24,0 (3,6)
Rsym <sup>2</sup>	0,127 (0,896)
Intervalo de resolución	50 - 2,50 Å
Rcryst <sup>3</sup> /Rfree <sup>4</sup>	0,152/0,185
Átomos distintos del hidrógeno	3451
Moléculas de agua	123
Promedio B, Global	29,59
Promedio B, Proteína	29,81
Promedio B, Agua	22,47
r.m.s.d. longitudes de enlace	0,007 Å
r.m.s.d. ángulos	1,163°

<sup>1</sup>Los valores entre paréntesis corresponden al nivel de resolución más alta, que es 2,51 Å - 2,50 Å.

<sup>2</sup>Rsym =  $\sum |I_{hi} - I_h| / \sum I_{hi}$ , donde I<sub>hi</sub> es la intensidad escalada de la i-ésima observación de reflexión relacionada con la simetría I<sub>h</sub> y I<sub>h</sub> es el valor medio.

<sup>3</sup>Rcryst =  $\sum |F_{o,h} - F_{c,h}| / \sum F_{o,h}$ , donde F<sub>o,h</sub> y f<sub>c,h</sub> son las amplitudes del factor de estructura observadas y calculadas para la reflexión h.

<sup>4</sup>Valor de R<sub>free</sub> se calcula para un 5% de reflejos elegidos aleatoriamente y no incluidos en el refinamiento.

En las figuras 14I -14L, las estructuras cristalinas de los Fab hu38E4.v1 y SP34v52 se compararon en la misma orientación. Cuando el péptido CD3 $\epsilon$  se superpuso al Fab SP34v52 con la misma orientación que en hu38E4.v1, se observaron claros enfrentamientos del péptido con SP34v52 (figura 14L). Se descubrió que los residuos R50 y R52 de HVR-H2 de SP34v52, que no estaban presentes ni en hu38E4.v1 ni en hu40G5c, eran importantes para la unión de CD3 por SP34v52 (figura 14L). Estos datos demuestran que hu38E4.v1 y hu40G5c se unen a CD3 de una manera distinta a la de SP34v52.

La estructura cristalina de hu38E4.v1 en complejo con el péptido N-terminal de CD3 $\epsilon$  se ilustra en las figuras 14M y 14N. La figura 14M proporciona una vista ampliada de las interacciones intermoleculares clave implicadas en el contacto con el sexto residuo en CD3 $\epsilon$ . En una vista ampliada, la figura 14N representa un modelo de relleno de espacio del complejo peptídico Fab/CD3 donde el quinto residuo apunta completamente en dirección contraria al sitio de interacción. El sexto residuo, como se muestra, participa en las interacciones con Fab y apunta al sitio activo.

## Ejemplo 2. Generación y selección de anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T (TDB)

Un enfoque para aprovechar el alto potencial citotóxico de los linfocitos T para erradicar las células tumorales ha sido el uso de anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T (TDB). Se han informado respuestas clínicas alentadoras con moléculas como los linfocitos B dirigidas a blinatumomab, el anticuerpo BiTE biespecífico CD19/CD3. Sin embargo, la promesa terapéutica de muchas modalidades de anticuerpos biespecíficos informadas se ha visto limitada por responsabilidades que incluyen problemas de farmacocinética (FC), toxicidad y/o producción desfavorables. En consecuencia, inicialmente generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 TDB que tienen combinaciones variadas de anti-CD3 y antígeno antitumoral (por ejemplo, anti-CD20, anti-FcRH5, anti-HER2, anti-LYPD1, anti-LY6E, anti-LY6G6D), anti-PMEL17, anti-CD19, anti-CD22, anti-CD33, anti-CD79A, anti-CD79B, anti-EDAR, anti-GFRA1, anti-MRP4, anti-RET, anti-Steap1, anti-TenB2), producidos como anticuerpos de longitud completa en formato de botón en ojal. Inesperadamente, encontramos que combinaciones particulares (pares) de brazos de antígeno anti-CD3 y antitumoral dieron como resultado que los TDB mostraran una actividad favorable sobre otros TDB.

Los anticuerpos TDB se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato botón en ojal como IgG1 humana, como se describe previamente (Atwell et al. J. Mol Biol. 270: 26-35, 1997). Los semianticuerpos se expresaron en células de *E. coli* o bien de ovario de hámster chino (CHO), se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A y los pares de semianticuerpos apropiados se hibridaron *in vitro* como se describe previamente (Spiess et al. Nat. Biotechnol. 2013). Si la producción del anticuerpo TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo puede incluir una mutación de aglucosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (por ejemplo, N297G), de tal manera que el anticuerpo TDB fuera una variante sin efector y que no pudiera iniciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La figura 15 muestra una descripción esquemática de la producción de TDB frente a CD3/CD20.

Después de su hibridación, los anticuerpos TDB anti-CD3/CD20 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos purificados aparecieron como un único pico (>99 % de la señal) en la filtración en gel con menos de un 0,2 % de agregados. No se detectaron homodímeros mediante espectrometría de masas. Los brazos anti-CD20 sometidos a prueba en la generación de TDB frente a CD3/CD20 incluyeron 2H7v16, 2H7v114, 2H7v511 y GA101. Los brazos anti-CD3 sometidos a prueba en la generación de TDB frente a CD3/CD20 incluyeron UCHT1v1, UCHT1v9, UCHT1vM1, 72H6, 13A3, 30A1, 41D9a, SP34v52, 40G5c, 38E4v1-38E4v9, 21B2, 125A1 y 21A9. Se sometió a prueba la unión de los TDB frente a CD3/CD20 a CD3, así como su actividad, evaluado por ensayos *in vitro* de destrucción de linfocitos B y ensayos de activación de linfocitos T.

### A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada una de las TDB frente a CD3/CD20 se sometieron a prueba mediante análisis por Biacore o FACS, como se describe anteriormente para los anticuerpos anti-CD3. En resumen, para los ensayos de unión con Biacore, se inmovilizó CD3 $\epsilon$  humano en una matriz de sensor CM5 de Biacore de la serie S usando el kit de acoplamiento de amina de Biacore y los anticuerpos TDB anti-CD3/CD20 o variantes de Fab de los mismos estaban en el flujo pasante. Para los ensayos de unión por FACS, se incubaron células Bjab (para antígeno CD3) con diversas concentraciones de anticuerpos TDB a 4 °C durante 30 minutos, a continuación, las células se lavaron e incubaron con el 2.º anticuerpo (anti-hulgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran de nuevo y estuvieran listas para el análisis por FACS. La figura 16 muestra los resultados de ensayos *in vitro* de unión FACS de TDB frente a CD3/CD20. Los resultados demuestran que combinaciones particulares de brazo de anticuerpo anti-CD3 y brazo de antígeno antitumoral (por ejemplo, brazo anti-CD20) dan como resultado anticuerpos TDB con propiedades de unión más favorables. La figura 17 muestra las afinidades de unión monovalentes y bivalentes para estos TDB frente a CD3/CD20 particulares. El emparejamiento particular de 2H7v16 con brazos anti-CD3 (por ejemplo, UCHT1v9), por ejemplo, dio como resultado un TDB frente a CD3/CD20

que mostró una unión inesperadamente fuerte a las células Bjab y Jurkat en comparación con los otros TDB frente a CD3/CD20 sometidos a prueba que tenían diferentes brazos anti-CD20. También se sometió a prueba la afinidad de unión de otras TDB frente a CD3/CD20 que tienen un brazo anti-CD20 2H7v16 y diversos brazos anti-CD3 (véanse las figuras 18-24).

### 8. Ensayos de destrucción de linfocitos B y de activación de linfocitos T *in vitro*

Los anticuerpos TDB anti-CD3/CD20 generados se sometieron a prueba para determinar su capacidad de mantener la destrucción de linfocitos B y la activación de linfocitos T citotóxicos. En estos ensayos, se obtuvieron líneas de células tumorales B (Bjab) de ATCC y se aislaron PBMC de sangre completa de donantes sanos mediante separación de Ficoll. Si fue necesario, los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se separaron con los kits de Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en RPMI1640 complementado con FBS al 10 % (Sigma-Aldrich) a 37 °C en una estufa de incubación para cultivos de células estándar humidificada. Para los ensayos de destrucción de células Bjab, se incubaron 20.000 células Bjab con células efectoras como huPBMC o bien linfocitos T purificados según las proporciones indicadas por ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante un periodo de tiempo indicado según el ensayo. Para los ensayos de destrucción de linfocitos B endógenos, se incubaron 200.000 huPBMC con diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante las horas indicadas según el ensayo. Al final de cada ensayo, los linfocitos B vivos se seleccionaron como linfocitos B PI-CD19+ o PI-CD20+ mediante FACS, y se obtuvo un recuento de células absoluto con microesferas de FITC añadidas a la mezcla de reacción como control de recuento interno. El % de destrucción de las células se calculó en base a controles no tratados con TDB. Los linfocitos T activados se detectaron mediante expresión en superficie de CD69 y CD25.

Las eficacias variadas de los anticuerpos TDB generados con biespecificidad para CD3 y una segunda molécula biológica (por ejemplo, CD20) subrayan las contribuciones críticas e impredecibles de ambos brazos del anticuerpo en la generación de un TDB ejemplar que posea una eficacia alta (véase las figuras 25-49).

#### Ejemplo 3. Caracterización de TDB frente a CD3/CD20 ejemplares (TDB frente a CD20)

Además, caracterizamos dos de los TDB frente a CD3/CD20 ejemplares (TDB frente a CD20) descritos anteriormente, que mostraron una alta eficacia en los ensayos *in vitro* de destrucción de linfocitos B y activación de linfocitos T. El brazo frente a CD20 de cada anticuerpo TDB era el clon anti-CD20 2H7.v16 (véase la figura 50), mientras que el brazo frente a CD3 era el clon UCHT1v9 (véase, por ejemplo, Zhu et al. En t. J. Cáncer. 62: 319-324, 1995) o el clon 40G5c de reactividad cruzada de macaco cangrejero (véase, por ejemplo, la figura 51), que comparte actividades comparables.

### Materiales y procedimientos

#### A. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos TDB se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato botón en ojal como IgG1 humana, como se describe previamente (Atwell et al. J. Mol Biol. 270: 26-35, 1997). Los semianticuerpos se expresaron en células de *E. coli* o bien de ovario de hámster chino (CHO), se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A y los pares de semianticuerpos apropiados se hibridaron *in vitro* como se describe previamente (Spiess et al. Nat. Biotechnol. 2013). Después de su hibridación, los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Los anticuerpos purificados aparecieron como un único pico (>99 % de la señal) en filtración en gel sin agregados detectables (figura 52A), y no se detectaron homodímeros mediante espectrometría de masas (figura 52B).

### 8. Ensayos de destrucción de linfocitos B y de activación de linfocitos T *in vitro*

Las líneas de células tumorales B se obtienen de ATCC y las PBMC se aislaron de sangre completa de donantes sanos mediante separación de Ficoll. Si fue necesario, los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se separaron con los kits de Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en RPMI1640 suplementado con FBS al 10 % (Sigma-Aldrich). Los linfocitos B vivos se seleccionaron como linfocitos B PI-CD19+ mediante FACS, y se obtuvo un recuento de células absoluto con microesferas de FITC añadidas a la mezcla de reacción como control de recuento interno. Los linfocitos T activados se detectaron mediante expresión en superficie de CD69 y CD25. Mediante FACS se detectó la inducción intracelular de granzima B. La concentración de perforina en los medios se detecta mediante ELISA (eBioscience). Todos los anticuerpos se adquirieron de BD Bioscience.

#### C. Estudios de eficacia *in vivo* en modelos murinos

Se adquirieron ratones NSG y SCID humanizados de Jackson Labs. Se produjeron ratones transgénicos CD20 humanos y ratones transgénicos CD3 humanos como se describe previamente (Gong et al. J. Immunol. 174: 817-826, 2005 y de la Here et al. J. Exp. Med. 173: 7-17, 1991), y se produjeron ratones doble transgénicos CD20/CD3

humanos cruzando los dos ratones transgénicos simples. Se generaron modelos de ratón con linfoma humano inyectando  $5 \times 10^6$  Células Bjab-luciferasa solas o mezcladas con  $10 \times 10^6$  PBMC de donantes humanos en HBSS por vía subcutánea en los flancos derechos de 40 ratones hembra. Los ratones fueron tratados por vía intravenosa con vehículo o 0,5 mg/kg de TDB frente a CD20 una hora después de la inoculación y una semana después del tratamiento inicial. Los tumores se midieron 1 o 2 veces por semana y el peso corporal se midió dos veces por semana hasta 7 días después del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, ya no se tomaban pesos para un animal dado. Si la pérdida de peso era superior al 15% del peso corporal total, los ratones afectados se pesaban diariamente, y se sacrificaban (o se avisaban al personal veterinario) si la pérdida de peso excedía el 20%. Se realizaron observaciones clínicas dos veces por semana durante la duración del estudio para controlar la salud de los animales; cualquier animal con un tumor de un tamaño o condición que pudiera interferir con la salud o actividad del animal fue sacrificado. De otro modo, los animales fueron sacrificados 6 meses después del tratamiento inicial o si el tumor se ulceró o su volumen superó los 2500 mm<sup>3</sup>.

Se generaron modelos de ratón con leucemia linfocítica crónica (CLL) derivados de pacientes como se describe previamente (Bagnara et al. Blood. 117: 5463-5472, 2011). En resumen,  $5 \times 10^5$  de linfocitos T activados se purificaron a partir de PBMC de CLL y se inyectaron retroorbitalmente en ratones NSG. Después del injerto de linfocitos T,  $2 \times 10^7$  de PBMC de CLL se inyectaron retroorbitalmente. Después de 14 días, se confirmó la circulación de los linfocitos B y T trasplantados mediante análisis por FACS. Los animales injertados con éxito fueron tratados posteriormente 3,5 semanas después con anticuerpos TDB administrados por vía intravenosa mediante inyección en la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados 6 o 14 días después del tratamiento. La sangre completa se recogió mediante punción del seno retroorbitario usando pipetas heparinizadas y se transfirió inmediatamente a tubos heparinizados, mientras los animales estaban bajo anestesia, o mediante punción cardíaca terminal, con una jeringa heparinizada después de la eutanasia con CO<sub>2</sub>. Los bazo se recogieron después de la eutanasia con CO<sub>2</sub>. Para cada estudio, se realizaron observaciones clínicas dos veces por semana para monitorizar la salud de los animales. El peso corporal de los animales se tomó al menos una vez por semana. Las PBMC se aislaron después de la lisis de los glóbulos rojos y se analizaron mediante FACS para detectar linfocitos B (muCD45+CD19+) y linfocitos T (muCD90.2+CD4+ o muCD90.2+CD8+). Todos los anticuerpos usados se adquieren de BD Biosciences o eBiosciences.

#### **D. Estudio FCFD en macacos cangrejeros**

Todos los estudios con macaco cangrejero se llevaron a cabo usando macacos cangrejeros de origen chino, sin exposición previa y criados para el propósito. Para el estudio de dosis única de FCFD, a 3 macacos cangrejeros macho se les administró una única dosis i.v. en bolo lento de 1 mg/kg de TDB frente a CD20; para el estudio de dosis repetidas, a 4 macacos cangrejeros se les administró una dosis i.v. en bolo lento de 1 mg/kg de TDB frente a CD20 una vez por semana para un total de 4 dosis. Se recogió sangre completa o tejidos en momentos seleccionados para el recuento de linfocitos B y T mediante FACS. Se recogió suero y se almacenó a -70°C hasta que se sometió a ensayo usando un ELISA para determinar la cantidad de artículo de prueba en cada muestra de suero. Se usaron perfiles de concentración sérica-tiempo de cada animal para estimar los parámetros farmacocinéticos (FC) usando el programa informático WinNonlin (Pharsight; Mountain View, CA).

#### **TDB frente a CD20 de alta calidad producido como IgG humanizada de longitud completa con propiedad FC de anticuerpo convencional**

Para explorar las propiedades de direccionamiento que podrían afectar la potencia de TDB dirigida a los linfocitos B, incluyendo la identidad del antígeno, el tamaño del dominio extracelular y la distancia del epítipo desde la membrana, creamos más de 40 TDB diferentes dirigidos a epítopos en CD3<sub>e</sub>, CD19, CD20, CD22, CD79a y CD79b. Los resultados representativos se muestran en la figura 56I. Descubrimos que los TDB más potentes eran aquellos que se dirigían a antígenos del cáncer con pequeños dominios extracelulares (ECD) y epítopos cerca de la membrana celular diana. Entre las mejores dianas estaban CD20, CD79a y CD79b con potencias de alrededor de 10 ng/ml o 67 pM para la destrucción de linfocitos B de donantes normales mediante linfocitos T autólogos.

Anti-CD20/CD3 TDB (CD20-TDB) se describe aquí como una molécula de prueba de concepto que muestra la actividad farmacológica de estos TDB dirigidos a linfocitos B. Las TDB frente a CD20 se produjeron como IgG de longitud completa y completamente humanizadas con una arquitectura de anticuerpos natural de bacterias, libres de homodímeros y agregados (figura 52). La propiedad farmacocinética (FC) de TDB frente a CD20 en ratas, una especie que no se une, se parece a la de otros anticuerpos IgG humanos, con una semivida de aproximadamente 7 días (figura 53).

#### **La destrucción de linfocitos B con TDB frente a CD20 depende de los linfocitos T por medio de la vía granzima-perforina**

Para evaluar TDB frente a CD20 como un tratamiento potencial para los trastornos proliferativos celulares, tales como las neoplasias malignas de linfocitos B CD20+, primero investigamos su mecanismo de acción como un anticuerpo biespecífico que recluta linfocitos T. A diferencia de la actividad ADCC, que es el principal mecanismo de acción del tratamiento clásico con anticuerpos monoclonales, TDB frente a CD20 no requiere la región Fc para

su actividad. La porción F(ab')<sub>2</sub> de TDB frente a CD20 retuvo la misma potencia que la IgG TDB frente a CD20 de longitud completa en la destrucción de linfocitos B (figura 54A). TDB frente a CD20 es un agonista condicional que requiere expresión diana, linfocitos T y anticuerpo para su actividad. La actividad de destrucción de linfocitos B de TDB frente a CD20 depende de los linfocitos T, ya que no se detectó ninguna destrucción de linfocitos B con PBMC disminuidas en linfocitos T CD3+ (figura 54B). La expresión diana se requiere para la activación de los linfocitos T, ya que ninguna expresión de CD20 da como resultado linfocitos T no activadas (figura 54C). TDB frente a CD20 es capaz de activar linfocitos T CD4+ y CD8+ según lo medido por la inducción de CD69 y CD25 en linfocitos T (figura 54D). Se puede lograr una destrucción de linfocitos B comparable con cualquiera de los linfocitos T como efectores, mientras que los linfocitos T CD8+ parecen ser más potentes en la destrucción de células BJAB, ya que los linfocitos T CD8+ dieron como resultado un mayor grado de destrucción celular que un número igual de linfocitos T CD4+ (figura 54C). Sin embargo, la regulación positiva de granzima es más prevalente dentro de los linfocitos T CD8+ (figura 54E), así como niveles más altos de perforina y liberación de granzimas A y B (no mostradas) asociadas con los linfocitos T CD8+ se detectaron en los medios mediante ELISA (figura 54F). Los linfocitos T activados son capaces de proliferar (figura 55). Sin embargo, el recuento global de linfocitos T no incrementó significativamente después de 24 horas en presencia de células TDB frente a CD20 y B sin suplemento de citoquinas *in vitro*, probablemente debido a las condiciones de cultivo. De hecho, se observó una sólida expansión de los linfocitos T *in vivo* de estudios de eficacia con modelos murinos y en macaco cangrejero (figuras 58A y 67C).

#### **TDB frente a CD20 potente para destruir células de leucemia/linfoma B y para destruir linfocitos B autólogos *in vitro***

La potencia de destrucción de linfocitos B de TDB frente a CD20 también se sometió a prueba con más de una docena de líneas celulares de leucemia/linfoma B *in vitro*. Para evaluar la potencia de CD20-TDB, se seleccionaron 8 líneas que representan células con un amplio rango de nivel de expresión de CD20 (figura 56B). Las curvas de destrucción de linfocitos B dosis-respuesta se muestran con las 8 líneas celulares, con PBMC aisladas de donantes sanos como células efectoras (figura 56A). Significativamente, CD20-TDB no tuvo actividad contra las células SU-DHL1 que carecen de expresión de CD20. La potencia del CD20-TDB estaba de alguna manera correlacionada con los diversos niveles de CD20 en la superficie detectados por citometría de flujo (56A). No obstante, TDB frente a CD20 es potente para destruir las 8 líneas de una manera dependiente de la dosis, con una CE50 que oscila entre 0,38 y 11 ng/ml durante un ensayo de 24 horas. El grado de destrucción celular varía de algún modo entre el 60 y el 90 % con hasta 1000 ng/ml de TDB en un ensayo de 24 horas (figura 56C). En general, la destrucción completa de los linfocitos B se puede lograr con una mayor concentración de anticuerpos o un tiempo de ensayo prolongado. Las células SU-DHL-1 se incluyen en el ensayo de destrucción como control negativo de CD20, donde no se observa destrucción celular, lo que demuestra el requisito de expresión diana para la actividad TDB de CD20. La actividad de TDB frente a CD20 parece requerir un nivel muy bajo de expresión diana, ya que las células Nalm-6 y SC-1 que se muestran aquí tienen todas una expresión superficial de CD20 muy baja (figura 56B). La afinidad de unión monovalente de TDB frente a CD20 para CD20 es más débil que la afinidad de unión bivalente del anti-CD20 original, con una K<sub>D</sub> de 54 nM determinado por scatchard. Tomados conjuntamente, el valor K<sub>D</sub> y la potencia de destrucción de linfocitos B TDB frente a CD20, la ocupación del receptor requerida para la actividad de TDB frente a CD20 es solo inferior al 0,1 %. Los TDB generados para atacar diferentes antígenos de linfocitos B también son eficaces para mediar la destrucción de linfocitos B como se muestra en la figura 56D, donde los TDB dirigidos a 5 antígenos de linfocitos B diferentes, incluyendo un TDB frente a CD20 (TDB A: 2H7v16/UCHT1v9), destruyeron del 75% al 90% de las linfocitos B. TDB frente a CD20 puede mediar aún más en la destrucción de líneas de linfoma B adicionales con expresión variable del antígeno de superficie CD20 (figura 56E).

TDB frente a CD20 también es muy potente en la destrucción de linfocitos B autólogos, sometido a prueba con PBMC humanas aisladas de sangre periférica de donantes sanos (figura 56F). En la figura 56F se muestran las curvas de destrucción en respuesta a la dosis para 8 donantes aleatorios, así como un gráfico resumen de CE50 y el grado de destrucción de linfocitos B (figura 56G) con 1000 ng/ml de anticuerpo en un ensayo de 24 horas para 30 donantes. De las 30 muestras analizadas, del 57 al 96 % de los linfocitos B fueron eliminados con hasta 1000 ng/ml de anticuerpo en 24 horas, con una CE50 que oscilaba entre 0,43 y 135 ng/ml con un valor medio de menos de 3 ng/ml. El grado de destrucción de linfocitos B en 24 horas mediante TDB frente a CD20 es muy comparable o mayor que el de destrucción de linfocitos B mediante un scFv anti-CD3/anti-CD19 (figura 56H).

#### **TDB frente a CD20 es potente para disminuir los linfocitos B *in vivo* en modelos murinos**

Como nuestro TDB frente a CD20 sometido a prueba no reconoce los antígenos CD20 y CD3 murinos, aprovechamos ratones transgénicos CD20 humanos y CD3 humanos (descritos anteriormente) para producir ratones doble transgénicos CD3/CD20 humanos para estudios de eficacia posteriores *in vivo*. Como se muestra en la figura 57A, los ratones doble transgénicos CD3/CD20 humanos expresan huCD3<sub>ε</sub> en la superficie de los linfocitos T CD4+ y CD8+ además de huCD20 en la superficie de los linfocitos B CD19+ en niveles detectables en comparación con los linfocitos T y B de origen humano. Con ratones transgénicos CD20 humanos, solo rituximab es capaz de disminuir los linfocitos B, ya que TDB frente a CD20 no puede atacar linfocitos T murinos sin expresión de CD3 humano (figura 57B). Mientras que con ratones doble transgénicos CD3/CD20 humanos, TDB frente a CD20 es capaz de atacar linfocitos T murinos que expresan huCD3, y es potente para disminuir los linfocitos B murinos que expresan huCD20 (figura 57C). TDB frente a CD20 parece ser más potente para disminuir los linfocitos

B *in vivo*, ya que se detectan menos linfocitos B en el bazo de ratón 7 días después de una dosis única intravenosa de TDB frente a CD20 a 0,5 mg/kg, en comparación con después de una dosis única de rituximab a 10 mg/kg. Aquí se usó como control de isotipo un TDB frente a HER2, que tiene el mismo brazo frente a CD3 mientras que el otro brazo se une a HER2, y aquí no mostró actividad en la disminución celular.

5 Para explorar la dosis eficaz más baja de TDB frente a CD20 para disminuir los linfocitos B con ratones doble transgénicos CD3/CD20 humanos, los ratones fueron tratados con una dosis única de TDB frente a CD20 desde 0,5 mg/kg hasta 0,00005 mg/kg. A continuación se controló el recuento de linfocitos B en sangre los días D1 (24 horas después de la dosis), D8 y D15. Se observó una disminución del recuento de linfocitos B en el D1 y la  
10 disminución de los linfocitos B se mantuvo hasta el D15 después del tratamiento con TDB frente a CD20 (figura 58A). De acuerdo con esta observación del recuento de linfocitos B en sangre, se logró una depleción casi completa de linfocitos B en el bazo de ratón en el día D7 después de una dosis única de 0,5 mg/kg, mientras que una dosis más baja de 0,05 mg/kg dio lugar a una depleción parcial y parcial de los linfocitos B del bazo y se aproximó a un nivel de dosis DE50 (figura 58B). Un estudio a lo largo del tiempo con ratones doble transgénicos reveló que la  
15 disminución de los linfocitos B es casi completo en los bazos tan pronto como 3 días después del tratamiento de dosis única de 0,5 mg/kg, sin signos significativos de recuperación de los linfocitos B hasta el día 14 (figura 58A). Como se ve en la figura 58C, TDB frente a CD20 media la disminución de los linfocitos B en la periferia del transgénico doble huCD20/huCD3, que se detecta en la sangre tan pronto como dos horas después del tratamiento y se mantiene hasta siete días después del tratamiento. Además, los linfocitos T CD8+ y CD4+ activados son  
20 detectables en la sangre a las dos horas de la administración de TDB frente a CD20 y a continuación disminuyen dos días después del tratamiento (figura 58D).

Además, TDB frente a CD20 disminuyó los linfocitos B de la zona marginal (MZB) (figura 59A y figura 59B) tan eficazmente como los linfocitos B foliculares (FOB) (figura 59A y figura 59C) en bazos de ratón, después de una  
25 única dosis intravenosa de 0,5 mg/kg. Observamos que los linfocitos B esplénicos disminuyeron aproximadamente un 50 % desde el valor inicial el día 1 (24 horas después de la dosis) y continuaron disminuyendo rápidamente hasta alcanzar un nadir el día 3 que se mantuvo durante todo el estudio. Aparentemente, esto es diferente del informe anterior con rituximab, donde se cree que el microambiente desempeña un papel en la eficacia de rituximab, lo que sugiere un modo de acción diferente para TDB frente a CD20 *in vivo* que el de rituximab. La  
30 activación de linfocitos T murinos normalmente se observa tan pronto como 30 minutos después del tratamiento con TDB frente a CD20 en sangre, y principalmente dentro de las primeras 24 horas en el bazo (figuras 59D y 59E). Después de la activación de los linfocitos T, se observó un incremento en el recuento de linfocitos T alrededor de D2-D3 (figura 59D y 59E), como resultado de la proliferación celular. Para el día 2, la mayoría de los linfocitos T ya no eran positivos para CD69, aunque los niveles de células CD69+ CD8+ continuaron oscilando entre el 10 y  
35 el 30 % durante el resto del estudio de dos semanas. Sin embargo, posiblemente debido a la destrucción celular inducida por la activación, el recuento de linfocitos T tiende a disminuir después de la fase de expansión. El recuento de linfocitos T se recuperará eventualmente después del tratamiento con TDB, lo que sugiere que no hay efecto inhibitor del tratamiento con TDB frente a CD20 en la regeneración de linfocitos T murinos.

También se usaron ratones NSG humanizados para validar aún más la potencia de TDB frente a CD20 en la  
40 disminución de los linfocitos B en modelos murinos y en un entorno de dosis repetidas. Los ratones reales inscritos en el estudio mostrados en las figuras 60A-60D tenían 35-80 % de células CD45+ humanas en sangre periférica, y el intervalo de células CD4+, CD8+ y CD20+ era 12-25, 2,1-8,7 y 32-60 % respectivamente (porcentaje informado como fuera de la rango de leucocitos viables). En la figura 60E se muestran ejemplos representativos de esta  
45 caracterización inicial. Los niveles de antígenos diana CD3 y CD20 de estos ratones se compararon con los de donantes humanos normales y se encontró que no eran significativamente diferentes (figura 60F). Como se muestra en la figura 59, los ratones NSG humanizados se trataron con 3 dosis semanales de TDB frente a CD20 a 0,5 mg/kg. Los linfocitos B se disminuyeron en la sangre en D7, y casi no se detectaron linfocitos B en D21 (figura 60A). También se observó una fuerte disminución de los linfocitos B en los bazos de los ratones tratados con TDB  
50 en D21 (figura 60B). Además, el tratamiento de ratones NSG humanizados con TDB frente a CD20 estimuló la proliferación de linfocitos T y condujo a la disminución de los linfocitos B como se muestra en la figura 60C. Para los linfocitos T CD8+, sus recuentos celulares incrementaron hasta 10 veces en la sangre en D7 y regresaron al valor inicial o menos en D14 y D21 (figura 60D). También se observó una tendencia similar para los linfocitos T CD4+.

#### 55 **TDB frente a CD20 es potente para destruir las células CLL B *in vitro* e *in vivo***

También se sometió a prueba la potencia de TDB frente a CD20 para destruir células leucémicas B con linfocitos T autólogos de pacientes con CLL, donde la carga tumoral B suele ser alta mientras que el recuento de linfocitos T es bajo y la función de los linfocitos T se podría ver potencialmente comprometida (Riches et al. Semin. Cancer  
60 Biol. 20(6): 431-438, 2010). Las PBMC aisladas de sangre periférica de nueve pacientes con CLL se incubaron con una única dosis alta de 1000 ng/ml de TDB frente a CD20 durante un máximo de 48 horas. Como se muestra en la figura 61A, TDB frente a CD20 es potente para destruir linfocitos B de CLL con linfocitos T autólogos. Para las 2 muestras mostradas, la carga tumoral de leucemia B es del 70 % con 8,4 % de linfocitos T CD8+ en PBMC para la muestra del paciente n.º 1 y del 80 % con 4,4 % de linfocitos T CD8+ para la muestra del paciente n.º 2.  
65 TDB frente a CD20 aparentemente puede lograr una destrucción eficaz de los linfocitos B con proporciones muy bajas de efector-diana (1:8 y 1:18 con las 2 muestras que se muestran aquí). La destrucción de linfocitos B CLL

con linfocitos T autólogos mediante TDB frente a CD20 está altamente correlacionada con el recuento de linfocitos T CD8+ (figura 61B). Descubrimos que el contenido de linfocitos T varió significativamente (entre 0,4 y 8% de las células mononucleares) y, sorprendentemente, observamos que el grado de citólisis de los linfocitos B en comparación con los valores previos al tratamiento estaba altamente correlacionado con el contenido de linfocitos T. Al complementar los linfocitos T CD8+ purificados con las PBMC de CLL, donde hay muy pocos linfocitos T autólogos disponibles, las células leucémicas B fueron destruidas eficazmente por TDB frente a CD20 de una manera dependiente de los linfocitos T (figura 61C).

TDB frente a CD20 también es potente para disminuir las células leucémicas CLL injertadas en ratones (figura 62A). En resumen, a ratones NSG se les injertaron células leucémicas del paciente después del injerto de linfocitos T activados autólogos derivados del paciente, y el tratamiento se inicia después del establecimiento confirmado del injerto leucémico. La tinción con IHC de ejemplos representativos de bazos de ratón mostró un injerto exitoso de células leucémicas B y linfocitos T autólogos de pacientes con CLL en ratones NSG. Después de una dosis única de tratamiento con CD20-TDB a 0,1 o 0,5 mg/kg, se pudieron detectar pocos linfocitos B. También se observó una depleción de linfocitos B con el tratamiento con rituximab, mientras que no se detectó ninguna depleción de linfocitos B con TDB frente a HER2 como control de isotipo. (Figura 62B).

En el contexto de la progresión tumoral, el tratamiento con TDB frente a CD20 es eficaz para prevenir el crecimiento de tumores de linfoma de linfocitos B en presencia de PBMC de donantes humanos. Los ratones SCID (inmunodeficiencia combinada grave) trasplantados con células Bjab humanas desarrollaron tumores detectables cuando se trataron con vehículo o TDB frente a CD20 solo el día 12 después de la inoculación. Además, el trasplante de solo PBMC retrasó el crecimiento del tumor, pero estos ratones desarrollaron tumores detectables el día 25 después de la inoculación. Por tanto, TDB frente a CD20 también es eficaz para prevenir el crecimiento tumoral *in vivo* en presencia de células efectoras PBMC (figura 63).

#### La potencia de TDB frente a CD20 requiere un nivel de expresión de CD20 muy bajo

Además del requisito diferente de la región Fc del anticuerpo para la actividad TDB frente a CD20 en comparación con el anti-CD20 convencional, y posiblemente una dependencia diferente del microambiente tumoral, TDB frente a CD20 también parece requerir un nivel más bajo de expresión del antígeno para la destrucción eficaz de los linfocitos B. Para las células Bjab, que tienen un alto nivel de expresión de CD20 (figura 64A), se logró una destrucción celular comparable con rituximab y TDB frente a CD20 (figura 64B). Sin embargo, las células Nalm-6, SC-1 y OCI-Ly19 con un nivel muy reducido de expresión de CD20 (figura 64A) solo fueron eliminadas por TDB frente a CD20, mientras que no se detectó destrucción celular con rituximab (figura 64C). El número estimado de copias de CD20 para estas líneas celulares con bajo contenido de CD20 es inferior a 500, en base a los datos de unión de scatchard y FACS en comparación con las células BJAB (datos no mostrados). Además, la afinidad de unión monovalente de CD20-TDB por CD20 es ~50-100 nM, significativamente menor que la afinidad de 1-5 nM de rituximab (ambas medidas mediante scatchard). Tomados conjuntamente, la potencia de CD20-TDB es consecuente con la noción de que la activación de TCR solo requiere una baja ocupación del receptor de 10 a 100 moléculas Purbhoo, M.A., et al. Nat Immunol 5:524-530, 2004; Irvine, D.J. et al. Nature 419:845-849, 2002; Sykulev, Y., et al. Immunity 4:565-571, 1996).

#### TDB frente a CD20 es activo en presencia de rituximab y esteroides

Dado que rituximab y su combinación con quimioterapia se usan ampliamente en el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B en la clínica, es importante explorar cómo se puede usar TDB frente a CD20 en este contexto, ya que tanto TDB frente a CD20 como rituximab se dirigen al mismo antígeno. Aprovechamos rituximab-DANA, una variante de rituximab sin efector (rituximab que contiene sustituciones de los residuos 265 y 297 por alanina (mutaciones de DANA descritas en Patentes de EE. UU. Nos. 7.332.581 y 8.219.149)), que solo se une a CD20 sin actividad de destrucción de linfocitos B, como se sometió a prueba en ratones doble transgénicos CD20/CD3 humanos (figura 64D). El tratamiento previo de células diana de linfocitos B de donantes normales con esta molécula inerte de rituximab que compite con la unión de CD20-TDB tuvo un efecto notablemente mínimo al mitigar la actividad de CD20-TDB. En concentraciones de hasta 250 µg/ml de rituximab-DANA (un exceso de 5000 veces sobre el nivel de dosis de CE50 de 42 ng/ml), observamos solo cambios modestos en las curvas de dosis-respuesta *in vitro* (cambio de menos de 7 veces en la CE50, 42 frente a 320 ng/ml). Extraordinariamente, TDB frente a CD20 todavía está activo en este entorno. Aunque la CE50 para CD20-TDB incrementó hasta ~7 veces con una mayor concentración de rituximab-DANA, el grado de destrucción de linfocitos B no cambia significativamente (figura 65A). Esto es consecuente con nuestros hallazgos anteriores de que se requiere un nivel de expresión de antígeno muy bajo, o una ocupación de receptor muy baja, para la potencia de TDB frente a CD20. El observaciones *in vitro* se recapitulaban *in vivo* en ratones dual transgénicos CD3/CD20 que fueron pretratados con 2 o 10 mg/kg de la proteína rituximab-DANA y posteriormente expuestos a CD20-TDB. Aquí te mostramos *in vivo* que TDB frente a CD20 todavía está activo en la disminución de los linfocitos B en ratones pretratados con rituximab-DANA (figura 66). Estos resultados indican una gran versatilidad en las politerapias combinadas prospectivas para las neoplasias malignas de linfocitos B.

TDB frente a CD20 es un anticuerpo que recluta linfocitos T y su potencia depende de la activación de los linfocitos

T. También se exploró para ver si el tratamiento previo con esteroides, que potencialmente podría afectar la respuesta inmune de los linfocitos T, afectaría la actividad de TDB frente a CD20. TDB frente a CD20 *in vitro* todavía estaba activo para destruir linfocitos B en presencia de una alta concentración de dexametasona (figura 65B).

#### 5 Validación preclínica de TDB frente a CD20 como tratamiento potencial para neoplasias malignas de linfocitos B CD20+ en macaco cangrejero

También se realizó un estudio piloto de FCFD para TDB frente a CD20 en macaco cangrejero. En un estudio de dosis única, donde se trataron 3 animales una vez por vía intravenosa con 1 mg/kg de TDB frente a CD20, se observó una depleción completa de linfocitos B en la sangre (figura 67A), así como en el bazo y los ganglios linfáticos (figuras 67B y 67C), a los 7 días después del tratamiento con anticuerpos. Los controles históricos del vehículo se muestran como la media y la desviación estándar de 4 animales tratados con vehículo (figura 67D). No se observó pérdida aparente de linfocitos T, ya que tanto los linfocitos T CD8+ como los linfocitos T CD4+ estaban en un nivel comparable o superior al de los controles, cuando se calcula como % de linfocitos. La activación de los linfocitos T se detectó en la sangre 4 horas después de la dosificación. No se observó pérdida de linfocitos T y aparentemente se detectó un recuento de linfocitos T CD8+ más elevado en la sangre 7 días después del tratamiento (figura 67A).

También se sometió a prueba el efecto a largo plazo del tratamiento con TDB frente a CD20 en las células inmunitarias con un estudio de dosis repetidas de 4 semanas seguido de un período de recuperación de 8 semanas. En sangre de 4 animales tratados con una dosis semanal de 1 mg/kg, se midieron y representaron gráficamente para cada animal individual durante 77 días (figura 68A) los recuentos de linfocitos T Band, así como la concentración sérica de TDB frente a CD20. En los 4 animales, no se detectaron linfocitos B en la sangre poco después del tratamiento y no regresaron mientras la concentración sérica de TDB frente a CD20 permaneciera por encima de 100 ng/ml (animal 4502 frente a animales 4001, 4002 y 4503). Los recuentos de linfocitos T CD8+, así como el de linfocitos T CD4+ en menor medida, incrementaron significativamente después de la primera dosis y gradualmente volvieron a situarse entre el 25 y el 150 % de los valores iniciales. Tomado conjuntamente, TDB frente a CD20 es muy activo en la disminución de los linfocitos B, sin comprometer los linfocitos T.

La propiedad FC de TDB frente a CD20 también se resumió en la figura 68B, midiendo la concentración sérica de TDB frente a CD20 en ambos estudios. Como se demostró en el estudio de dosis repetidas, TDB frente a CD20 mantuvo una buena exposición en todo momento, con CL en aproximadamente 17 ml/día/kg durante la primera dosis (D0-D7). Le eliminación mediada por diana parece ser mayor durante la primera dosis (D0-D7), ya que el valor de CL disminuyó a aproximadamente 6 ml/día/kg durante la cuarta dosis (D21-28).

#### 35 Combinación de TDB frente a CD20 con antagonista de PD-L1 en un modelo de tumor singénico

También se sometió a prueba la eficacia *in vivo* de un TDB frente a CD20 en combinación con un antagonista de PD-L1 (un anticuerpo anti-PD-L1 de isotipo IgG2a murino, 25A1, con mutaciones DANA) en un modelo de tumor singénico. En este estudio, se utilizaron células de linfoma B de ratón A20-huCD20 que expresan CD20 humano y PD-L1 de ratón en su superficie celular para generar un modelo de tumor singénico (véase, por ejemplo, figura 69A). El TDB frente a CD20 usado fue un TDB 2H7v16/2C11 isotipo IgG2a murino producido en formato de botón en ojal (K y H) (véase, por ejemplo, Atwell et al., J Mol Biol., 270:26-35, 1997), en el que el brazo de "botón" es anti-CD20 2H7v16 y el brazo de "ojal" es anti-CD3 2C11 (Leo et al., Proc Natl Acad Sci USA, 84:1374-8, 1987). El antagonista de PD-L1 usado fue un anticuerpo anti-PD-L1 de isotipo IgG2a murino con mutaciones DANA Fc (sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina; véase, por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nos. 7.332.581 y 8.219.149).

El día -7, se inocularon por vía subcutánea 65 ratones Balb/C en el área torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20pRK-CD20-GFP en HBSS en un volumen de 100 µl (sin exceder los 200 µl). A los ratones se les permitió desarrollar tumores. Luego se pesaron y midieron los ratones 1 o 2 veces por semana hasta que los tumores alcanzaron un volumen tumoral medio de aproximadamente 100 a 200 mm<sup>3</sup> (aproximadamente 7 días después de la inoculación). Los animales fueron reasignados a los siguientes grupos de tratamiento: Grupo 1: 2,5 millones de A20/CD20, vehículo, qwx3, i.v., n=9; grupo 2: 2,5 millones de A20/CD20, anti-CD20xCD3 K y H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murina), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v., n=9; grupo 3: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mlgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, i.p., n=9; y grupo 4: 2,5 millones de A20/CD20, aPDL1 (25A1, mlgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, i.p. + anti-CD20xCD3 K y H TDB (2H7-2C11 IgG2 murina), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v., n= 9. Los ratones no reclutados en uno de los grupos de tratamiento anteriores debido a un volumen tumoral diferente fueron sacrificados. El tratamiento comenzó el día 0 y toda la dosificación de anticuerpos se realizó por vía intravenosa en un volumen de 100 ml como se describe anteriormente.

Se midieron los tumores 1-2 veces por semana. Se midieron los pesos corporales dos veces por semana hasta los 7 días después del tratamiento final. Si no se observaba pérdida de peso, ya no se tomaban pesos. Si se observaba que la pérdida de peso era >15%, los ratones afectados se pesaban diariamente y se sacrificaban si la pérdida de peso era mayor o igual al 20%. Durante todo el estudio, se realizaron observaciones clínicas dos veces por semana para controlar la salud de los animales, y cualquier animal con un tumor de un tamaño o condición que pudiera

interferir con la salud o la actividad del animal fue sacrificado.

Como se representa en la figura 69B, el tratamiento combinado de TDB frente a CD20 con anticuerpo anti-PD-L1 (grupo 4) exhibió un efecto inesperado y sinérgico en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con TDB frente a CD20, anticuerpo anti-PD-L1 o vehículo solo.

#### Combinación de TDB frente a CD20 con antagonista de PD-1 en un modelo de tumor singénico

Además, la eficacia *in vivo* de un TDB frente a CD20 en combinación con un antagonista de PD-1 (un anticuerpo anti-PD1 de isotipo IgG2 murino, 8F11, con mutaciones DANA) también se sometió a prueba en el modelo de ratón con linfoma B singénico A20/huCD20. En este estudio, el TDB frente a CD20 usado fue un TDB 2H7v16/2C11 isotipo IgG2a murino, y el antagonista de PD-1 usado fue un anticuerpo anti-PD-1 isotipo IgG2 murino con mutaciones DANA Fc.

Se transfectaron células de linfoma B de ratón A20 para expresar CD20 y GFP humanos y posteriormente se clasificaron células individuales para selección clonal y expansión para implantación. Se inocularon por vía subcutánea ratones hembra Balb/c (Charles River; Hollister, CA) de 8-10 semanas de edad en la región torácica unilateral derecha con 2,5 millones de células A20.hCD20-GFP. Cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral medio de 100-200 mm<sup>3</sup>, los ratones se reclutaron y aleatorizaron en uno de los cuatro grupos de tratamiento (n = 9 ratones/grupo) y el tratamiento con anticuerpos comenzó el día 1 siguiente: Grupo 1 (2,5 millones de A20/CD20, vehículo, qwx3, i.v.); grupo 2 (2,5 millones de A20/CD20, anti-CD20xCD3 K y H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murina), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v.); grupo 3 (2,5 millones de A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mlgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, i.p.); y grupo 4 (2,5 millones de A20/CD20, anti-PD1 (8F11, mlgG2a DANA), 10 mg/kg, tiwx3, i.p. + anti-CD20xCD3 K y H TDB (2H7v16-2C11 IgG2 murina), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v.).

Los ratones fueron tratados con vehículo o TDB frente a CD20 a 0,5 mg/kg i.v. semanalmente durante 3 semanas, y/o anticuerpo anti-PD-1 a 10 mg/kg intravenoso para la primera dosis, seguido de una dosis IP 3 veces por semana durante 3 semanas. (N = 9 ratones/grupo)

Como se representa en las figuras 108A y 108B, el tratamiento combinado de TDB frente a CD20 con anticuerpo anti-PD-1 (grupo 4) exhibió un efecto inesperado y sinérgico en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con TDB frente a CD20, anticuerpo anti-PD-1, o vehículo solo.

#### Ejemplo 4. Generación y caracterización de TDB frente a CD3/FcRH5 ejemplares (TDB frente a FcRH5)

También exploramos la capacidad de los anticuerpos TDB para reclutar las actividades citotóxicas de los linfocitos T para erradicar las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, FcRH5. Para este fin, generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 biespecíficos que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-FcRH5 (TDB frente a FcRH5). Los anticuerpos TDB frente a FcRH5 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato botón en ojal como IgG1 humana, como se describe previamente (Atwell et al. J. Mol Biol. 270: 26-35, 1997). Los semianticuerpos se expresaron en células de *E. coli* o bien de ovario de hámster chino (CHO), se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A y los pares de semianticuerpos apropiados se hibridaron *in vitro* como se describe previamente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Después de su hibridación, los anticuerpos TDB anti-CD79b/FcRH5 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. El brazo anti-FcRH5 usado en la generación de TDB frente a FcRH5 era de un anticuerpo anti-FcRH5 1G7 que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 268 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 269. Los brazos anti-CD3 sometidos a prueba en la generación de TDB frente a FcRH5 incluyeron UCHT1v9, 40G5c y 38E4v1.

Se sometió a prueba la unión de los TDB frente a FcRH5 específicos a linfocitos T CD8+ (unión a CD3), así como la actividad, evaluado por ensayos *in vitro* de citotoxicidad y ensayos de activación de linfocitos T.

#### A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada una de las TDB frente a FcRH5 se sometieron a prueba mediante análisis por FACS, como se describe anteriormente para las TDB frente a CD20. En resumen, para los ensayos de unión por FACS, se incubaron linfocitos T CD8+ con diversas concentraciones de anticuerpos TDB frente a FcRH5 a 4 °C durante 30 minutos, a continuación, las células se lavaron e incubaron con el 2.º anticuerpo (anti-hulgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran de nuevo y estuvieran listas para el análisis por FACS. La figura 70 muestra los resultados ensayos de unión *in vitro* FACS de TDB frente a FcRH5. Los resultados demuestran que la combinación particular del brazo del anticuerpo anti-CD3, 38E4v1, junto con el brazo anti-FcRH5, 1G7, da como resultado un anticuerpo FcRH5 con mayor afinidad de unión por las células efectoras.

### 8. Ensayos de destrucción de células diana MOLP-2 y de activación de linfocitos T *in vitro*

También se sometió a prueba la capacidad de los TDB frente a FcRH5 generados para favorecer la destrucción de células diana MOLP-2 que expresan FcRH5 y la activación del efecto citotóxico de los linfocitos T. Se controló la citotoxicidad *in vitro* mediante citometría de flujo. Las células diana se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554) Las células diana marcadas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) y los linfocitos T CD8+ purificados de PBMC humanas se mezclaron en una proporción de 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + FBS al 2% + EDTA 1 mM + yodo propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato automatizado. Se contó el número de células diana vivas seleccionando células CFSE+/IP negativas. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como sigue: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB - número de células diana vivas con TDB)/(número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se representa en las figuras 71A y 71B, los TDB frente a FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su brazo anti-CD3 mostraron una fuerte destrucción *in vitro* de células diana MOLP-2 en comparación con TDB frente a FcRH5 que tiene 40G5c como brazo anti-CD3.

Cuando se sometieron a prueba en los ensayos de activación de linfocitos T, las figuras 72A-72D muestran que los TDB frente a FcRH5 con UCHT1v9 o 38E4v1 para su brazo anti-CD3 fueron capaces de inducir de manera robusta la actividad de los linfocitos T *in vitro*, en comparación con TDB frente a FcRH5 que tiene 40G5c como brazo anti-CD3. En estos ensayos, se mezclaron células diana y linfocitos T CD8+ purificados en presencia o ausencia de TDB y la activación de los linfocitos T se analizó mediante citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634), CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). De forma alternativa, después de teñir la superficie con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y permeabilizaron con solución Cytofix/CytoPerm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron intracelularmente con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de los linfocitos T se evaluó mediante el porcentaje de células CD8+CD69+, CD8+CD107a+ y CD8+CD69+granzimaB+.

#### Ejemplo 5. Generación y caracterización de TDB frente a CD3/HER2 ejemplares (TDB frente a HER2)

También exploramos la capacidad de los anticuerpos TDB para reclutar las actividades citotóxicas de los linfocitos T para erradicar las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, HER2. Para este fin, generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 biespecíficos que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2 (TDB frente a HER2). Como se describe anteriormente, los TDB frente a HER2 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato botón en ojal como IgG1 humana, como se describe previamente (Atwell et al. J. Mol Biol. 270: 26-35, 1997). Los semianticuerpos se expresaron en células de *E. coli* o bien de ovario de hámster chino (CHO), se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A y los pares de semianticuerpos apropiados se hibridaron *in vitro* como se describe previamente (Spiess et al. Nat. Biotechnol. 2013). Si la producción del anticuerpo TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo puede incluir una mutación de aglucosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (por ejemplo, N297G), de tal manera que el anticuerpo TDB fuera una variante sin efector y que no pudiera iniciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Después de su hibridación, los TDB frente a HER2 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. Un brazo anti-HER2 usado en la generación de TDB frente a HER2 fue el de anticuerpo anti-HER2 hu4D5, que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 270 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271. Se generaron TDB frente a HER2 adicionales para dirigirse a diferentes regiones del dominio extracelular (ECD) de HER2. Se usó un anticuerpo anti-HER2 2C4 como brazo anti-Her2 que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 593 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 594. Otro anticuerpo anti-HER2 usado como un brazo anti-HER2 fue el de anticuerpo anti-HER2, 7C2 que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 595 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 596. Otros brazos anti-HER2 usados en la generación de TDB frente a HER2 incluyeron variantes de afinidad de hu4D5, hu4D5.91A y hu4D5.Y100A (descritas en EE.UU. 7.435.797).

Se sometió a prueba la unión de las TDB frente a HER2 específicas a linfocitos T CD8+ (unión a CD3) y células SKBR3 (unión a Her2), así como su actividad, evaluado por ensayos *in vitro* de citotoxicidad y ensayos de activación de linfocitos T.

#### A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada una de las TDB frente a HER2 se sometieron a prueba mediante análisis por FACS, como se describe anteriormente para las TDB frente a CD20. En resumen, para los ensayos de unión por FACS, se incubaron células Jurkat (para antígeno CD3), células CD8+ humanas (para antígeno CD3), o SKBR3 (para antígeno Her2) con diversas concentraciones de anticuerpos TDB frente a HER2 a 4 °C durante 30 minutos, a continuación, las células se lavaron e incubaron con el 2.º anticuerpo (anti-hulgG-PE; BD Bioscience; o anti-hulgG-AlexaFluor647, Southern Biotech) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran de nuevo

y estuvieran listas para el análisis por FACS. La media geométrica de fluorescencia se leyó mediante citometría de flujo. Las figuras 73, 76A, 78A-78C, 79A y 80A-80B muestran los resultados de ensayos de unión FACS de TDB frente a HER2 *in vitro*. Se sometieron a prueba múltiples brazos de HER2 que se unen a diferentes regiones de HER2 en combinación con múltiples brazos frente a CD3 que se unen a diversas regiones de CD3ε para caracterizar las propiedades de unión de cada combinación. La figura 76A proporciona la estructura cristalina del ECD de HER2 y la de CD3ε y resalta las regiones a las que se unen los diferentes brazos de HER2 y CD3 para cada uno. El anticuerpo hu4D5 HER2 se conoce como trastuzumab y se une a un epítipo en el dominio IV de HER2, que es la región proteica más cercana a la membrana celular. El anticuerpo monoclonal humanizado recombinante 2C4 (rhuMAb 2C4) también se conoce como pertuzumab y se une a un epítipo en el dominio II de HER2 que está a 50 angstroms de donde se une hu4D5. Pertuzumab (PERJETA®, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primero de una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (HDI) y funciona para inhibir la capacidad de HER2 para formar heterodímeros u homodímeros activos con otros receptores HER (tales como EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4) (Harari and Yarden. *Oncogene* 19:6102-6114, 2000; Yarden and Sliwkowski. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137, 2001; Sliwkowski. *Nat. Struct. Biol.* 10:158-159, 2003; Cho et al. *Nature* 421:756-60, 2003; y Malik et al. *Pro. Am. Soc. Cancer Res.* 44:176-177, 2003). El anticuerpo murino anti-HER2 7C2 se une a un epítipo en el dominio I de HER2 (Publicación PCT n.º WO 98/17797) que está a 100 angstroms de distancia de la región HER2 unida por hu4D5 (figura 76A).

Adicionalmente, se sometió a prueba la afinidad de unión de TDB frente a HER2 con múltiples brazos anti-CD3. Uno de los brazos anti-HER2 dados se combinó con brazos dirigidos a CD3 humanos de alta afinidad, tales como SP34 y 38E4v1. Otras combinaciones de TDB frente a HER2 incluyeron los brazos dirigidos a CD3 humano de baja afinidad 40G5c o el brazo dirigido a CD3 murino de 2C11. UCHT1v9 para su brazo anti-CD3 y hu4D5 para su brazo anti-HER2, denominados en el presente documento TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) o TDB frente a HER2, se compararon con el anticuerpo anti-HER2, trastuzumab y los fragmentos de trastuzumab-Fab en un ensayo de Scatchard competitivo (Ramírez-Carrozzi et al. *Nature Immunology.* 12: 1159-1166, 2011). En este ensayo, la unión a SKBR-3 se determinó mediante la unión competitiva de <sup>125</sup>I-trastuzumab Fab con trastuzumab, trastuzumab-Fab o TDB frente a HER2 biespecífico. La figura 74A muestra los resultados del ensayo Scatchard competitivo de TDB frente a HER2 *in vitro*.

### 8. Ensayos de destrucción de células diana SKBR3 y MCF7 y de activación de linfocitos T *in vitro*

Se sometieron a prueba *in vitro* las combinaciones TDB frente a HER2 de uno de los tres brazos anti-HER2 (hu4D5, 2C4 y 7C2) con el brazo anti-CD3 38E4v1 de alta afinidad o con el brazo anti-CD3 40G5c de baja afinidad para determinar su capacidad para mediar en la destrucción de células diana de células SKBR3 o MCF7 que expresan HER2 (figura 77). La actividad *in vitro* para TDB hu4D5 con cualquiera de los brazos anti-CD3 demostró ser más efectiva que los TDB 2C4 y 7C2 para mediar la destrucción máxima de células SKBR3 y MCF7, medida por su CE50 (figura 78). Esta actividad de destrucción también dependía del brazo frente a CD3 utilizado. La combinación del brazo anti-CD3 38E4v1 con uno cualquiera de los brazos anti-HER2 hu4D5, 2C4 o 7C2 fue más eficaz que la de las combinaciones 40G5c TDB frente a HER2 (figura 79). Pruebas adicionales de las 6 combinaciones de TDB frente a HER2 revelaron que su actividad de destrucción de células diana no depende del nivel de expresión de HER2 en las células diana. La figura 80 muestra que los TDB frente a HER2 no fueron selectivos para las células diana SKBR3 con alta expresión de HER2 sobre las células diana MCF7 con baja expresión de HER2. En cambio, la actividad de TDB frente a HER2 dependía de la afinidad del brazo anti-HER2 por HER2 (figura 81). Los TDB de baja afinidad por HER2 conservaron actividad en células MCF7 con baja expresión de HER2 y no fueron capaces de destruir selectivamente células SKBR3 amplificadas por HER2 (figura 82).

También se sometió a prueba la especificidad del brazo anti-HER2 para sus respectivos epítopos de HER2 en los TDB frente a HER2. La actividad de destrucción de hu4D5-40G5c TDB frente a HER2 fue limitada cuando se combinó con concentraciones crecientes de Trastuzumab (hu4D5). Sin embargo, la eficacia de trastuzumab no se ve afectada por la combinación de hu4D5 TDB con el anticuerpo hu4D5 (figura 83). Por el contrario, la destrucción de células diana mediada por 2C4-40G5c o 7C2 38E4v1 se bloquea mediante la coadministración de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes pertuzumab (2C4) o 7C2, respectivamente (figura 83). Cuando se sometieron a prueba brazos anti-HER2 adicionales en múltiples ensayos de afinidad, todos los clones que demostraron actividad alta o media de TDB frente a HER2 compitieron con trastuzumab o pertuzumab (figura 84). Para la identificación de TDB candidatos a ensayar *in vivo*, se sometieron a prueba brazos frente a CD3 de alta (38E4v1, 38E4 y SP34) y baja (40G5c y 2C11) afinidad *in vitro* con linfocitos T CD3+ humanizados derivados de ratón en combinación con brazos anti-HER2 hu4D5, 2C4 y 7C2 (figuras 85-86). A partir de este ensayo, se seleccionaron tres TDB candidatos en base a su actividad de destrucción para una mayor caracterización *in vivo*: hu4D5-SP34, hu4D5-2C11 y 2C4-38E4. El tratamiento de animales portadores de tumores que expresan HER2 con hu4D5-2C11 TDB frente a HER2 dio como resultado un incremento de células CD45+ y CD8+ en el tumor tan pronto como 4 horas después del tratamiento. Tras un análisis adicional, los tumores tratados con TDB frente a HER2 revelaron un incremento en los linfocitos T IFNγ+ y PD1+ CD8+, así como una mayor presencia de linfocitos T reguladores (Treg) (figura 87B). La detección de infiltrados inmunes aumentados en tumores también se correlacionó con una disminución en el volumen tumoral de los animales tratados con TDB frente a HER2 en comparación con el tratamiento de control con vehículo (figura 87A). En la figura 88A, el brazo anti-HER2 hu4D5 combinado con el brazo anti-CD3 de baja afinidad, 2C11 o el brazo anti-CD3 de alta afinidad, SP34, dieron como

resultado ambos regresión tumoral en ratones HER2 transgénicos. Sin embargo, esta respuesta no se observó con el brazo anti-HER2 2C4 de menor afinidad combinado con el brazo anti-CD3 de alta afinidad 38E4 (figuras 88A-88B).

5 TDB frente a HER2 también se comparó con trastuzumab bivalente y fragmentos de trastuzumab-Fab por su capacidad para inhibir directamente la proliferación de SKBR3. Las células diana SKBR3 que expresan HER2 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pocillo y se incubaron durante la noche para que las células se unieran antes del tratamiento con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo designado. La proliferación/viabilidad celular se analizó después de 6 días de tratamiento con CELLTITERGLO® ensayo de viabilidad de células luminiscentes (Promega, Madison, WI). Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 74B. Adicionalmente, un ensayo de citotoxicidad *in vitro* se realizó con trastuzumab, trastuzumab producido en *E. coli*, y TDB frente a HER2 para medir su capacidad para inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos mediada por células NK (ADCC) (Jefferis Trends in Pharmacological sciences. 30: 356-362, 2009; Simmons et al. Journal of Immunological Methods. 263: 133-147, 2002). Anticuerpos producidos en *E. coli* no están glucosilados, lo que resulta en una alteración de la unión de FcγR, que se requiere para mediar en la ADCC. El ensayo de citotoxicidad se realizó como en Junttila et al. (Cancer Research. 70: 4481-4489, 2010) con un kit de detección de citotoxicidad; LDH (Roche, Mannheim, Alemania). En resumen, las células lisadas se detectaron mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) después de 4 horas de tratamiento con el anticuerpo especificado. Los resultados se muestran en la figura 74C.

20 También se sometió a prueba la capacidad de los TDB frente a HER2 generados para respaldar la destrucción de las células diana SKBR3 que expresan HER2 y la activación del efecto citotóxico de los linfocitos T. La citotoxicidad *in vitro* se controló mediante citometría de flujo. Las células diana se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554). Las células diana marcadas con CFSE y los linfocitos T CD8+ purificados de PBMC humanas se mezclaron en determinada proporción E:T (como se indica en las leyendas de las figuras), con o sin TDB durante 24 horas. Al final de la incubación, las células se levantaron con tripsina y se recogieron de la placa. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + FBS al 2% + EDTA 1 mM + yodo propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato automatizado. Se contó el número de células diana vivas seleccionando células CFSE+/IP negativas. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como sigue: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB - número de células diana vivas con TDB)/(número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se muestra en la figura 75, TDB frente a HER2 mostró una fuerte destrucción *in vitro* de células objetivo SKBR3 en comparación con TDB frente a HER2 teniendo la variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como su brazo anti-HER2 (CE50 de hu4D5/UCHT1v9 TDB = 0,1 ng/ml; hu4D5.91A/UCHT1v9 TDB = 25,5 ng/ml; hu4D5.Y100A/UCHT1v9 TDB = no se puede determinar).

35 Adicionalmente, la afinidad de unión de la variante anti-HER2 hu4D5 (0,4 nM) al dominio extracelular (ECD) de HER2 es mayor que la de los brazos de HER2 2C4 (2,0 nM) y 7C2 (1,7 nM), que se muestra en la figura 76B. Además, la figura 76C muestra que hu4D5 TDB frente a HER2 es un mediador más potente de la destrucción de células diana MCF7 que 2C4 TDB frente a HER2 y 7C2 TDB frente a HER2. Adicionalmente se sometió a ensayo la cinética de la destrucción inducida por TDB frente a HER2. Como se ve en la figura 94A, no se detectó actividad de destrucción significativa a las 4-12 horas. Se detectó una destrucción robusta a las 24 horas y la actividad de destrucción se incrementó con el tiempo. Como se muestra en las figuras 90A - 90C y 92C, una comparación adicional de los brazos anti-CD3 de hu4D5 TDB frente a HER2 demostró la eficacia de los diferentes clones para mediar la destrucción de células SKBR3 que expresan HER2. En particular, dos TDB frente a HER2, hu4D5/38E4c y hu4D5/40G5c, fueron sorprendentemente tan eficaces o mejores para mediar en la destrucción de células diana que el TDB frente a HER2 hu4D5/SP34 (figuras 90B y 90C).

40 Cuando se sometieron a prueba en los ensayos de activación de linfocitos T, la figura 89 muestra que TDB frente a HER2 fue capaz de inducir de manera robusta la actividad de los linfocitos T *in vitro*, en comparación con el TDB frente a HER2 que tiene la variante de afinidad hu4D5 91A o Y100A como brazo anti-HER2. Tres brazos anti-CD3 (SP34, 38E4c y 40G5c) del hu4D5 TDB frente a HER2 ensayado mostraron diferentes afinidades de unión para el antígeno CD3 en linfocitos T CD8+ humanos, como se ve en la figura 91A. No obstante, los tres TDB frente a HER2 pudieron mediar la activación de los linfocitos T CD8+ (figura 91 B). En la figura 92D se muestra un análisis adicional de la capacidad de los brazos anti-CD3 38E4 y 38E4c de hu4D5 TDB frente a HER2 para mediar en la activación de linfocitos T CD8+. Se sometió a ensayo adicionalmente la cinética de la activación de los linfocitos T inducida por TDB frente a HER2. Los primeros signos de activación de linfocitos T (CD69) aparecieron 4 horas después de iniciar el tratamiento con TDB frente a HER2. Sin embargo, los marcadores de activación tardía (CD107a extracelular) se detectaron más tarde en el momento de las 24 horas (figura 94A). Adicionalmente, la activación de los linfocitos T no se detectó después de 48 horas cuando las células CD8+ se incubaron con TDB frente a HER2 o células diana que no expresan HER2 humano (células BJAB). Se observó una fuerte activación de linfocitos T cuando se usaron células HER2+ SKBR3 como dianas acompañadas de liberación de gránulos citotóxicos (figura 93A).

65 También sometimos a prueba la capacidad de TDB frente a HER2 para inducir la destrucción de células diana BT474 y se sometió a ensayo la activación de linfocitos T para las siguientes cinco proporciones de linfocitos T

CD8+ efectores con respecto a células diana: 1:5, 1:2, 1:1, 3:1, y 5:1. Este experimento revela que la citotoxicidad medida por la liberación de LDH se redujo significativamente mediante la titulación de células efectoras; sin embargo, incluso con una proporción E:T de  $\leq 1:1$ , se detectó una señal de LDH débil y una fuerte activación de los linfocitos T (figura 94B).

En estos ensayos, se mezclaron células diana y linfocitos T CD8+ purificados en presencia o ausencia de TDB y la activación de los linfocitos T se analizó mediante citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634), CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). Opcionalmente, las células se tiñeron con CD8-FITC y CD69-PE, donde la activación de los linfocitos T se evaluó mediante el porcentaje de CD8+CD69+ en células CD8+. De forma alternativa, después de teñir la superficie con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y permeabilizaron con solución Cytotfix/CytoPerm (BD Bioscience, 554722) y se tiñeron intracelularmente con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de los linfocitos T se evaluó mediante el porcentaje de células CD8+CD107a+.

Otra medida para la citotoxicidad mediada por linfocitos T para TDB frente a HER2 (UCHT1v9/hu4D5) medida es un ensayo de exocitosis granular. La figura 93B muestra los resultados de perforina soluble (Cell Sciences), granzima A y granzima B (eBioscience) detectadas en medios de crecimiento mediante ELISA según los protocolos del fabricante. En este ensayo, se utilizó un TDB de control (10 ng/ml), uno que comparte el mismo brazo frente a CD3 que TDB frente a HER2 pero tiene un brazo frente a diana irrelevante, o TDB frente a HER2 (10 ng/ml). Los anticuerpos se incubaron individualmente durante 18 horas con células diana SKBR3 y células mononucleares efectoras de sangre periférica (PBMC), que se separaron de la sangre de voluntarios sanos usando un medio de separación de linfocitos (MP Biomedicals, Solon, OH). La citotoxicidad *in vitro* se midió mediante la liberación de LDH como se describe anteriormente. Se realizaron una serie de ensayos apoptóticos con TDB frente a HER2 (1 ng/ml), PBMC efectoras y células diana SKBR3. Después de 24 horas de tratamiento, la exocitosis granular coincidió con una elevación significativa de la actividad de caspasa 3/7 inducida por TDB frente a HER2 (ensayo CASPASE-GLO<sup>®</sup> 3/7, Promega), apoptosis (ensayo ELISA<sup>plus</sup> de detección de destrucción celular, Roche) y citotoxicidad medida por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), que se describe anteriormente (figura 93C).

La capacidad de TDB frente a HER2 para inducir la destrucción de HER2 o de células 3T3 transfectadas con vector se midió mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH antes mencionado, donde no se detectó destrucción de células 3T3 transfectadas con vector después de 19 horas; por el contrario, las células 3T3 transfectadas con HER2 fueron destruidas de manera muy eficaz (figura 93D). El ensayo de destrucción se modificó para bloquear la unión del brazo frente a HER2 usando trastuzumab Fab (1  $\mu$ g/ml) o dominio extracelular de HER2 soluble (HER2 ECD) (1  $\mu$ g/ml) y dio como resultado una inhibición eficaz de la actividad de destrucción después de 24 horas (figura 93E). Para confirmar la dependencia de los linfocitos T de la destrucción, se disminuyeron las células CD3+ de las PBMC usando CD3+ MicroBeads de Miltenyi (n.º 130-050-101). La figura 93F muestra que la disminución dio como resultado la pérdida de la actividad de destrucción de células diana después de 19 horas, evaluado mediante análisis por FACS en presencia de TDB frente a HER2.

#### **TDB frente a HER2 induce la proliferación de linfocitos T**

Para investigar si TDB frente a HER2 induce la proliferación de linfocitos T, se cocultivaron linfocitos T CD8+, células diana (SKBR3) y TDB frente a HER2 0,1  $\mu$ g/ml, seguido de un cultivo de linfocitos T en ausencia de células diana y TDB frente a HER2. La proliferación de linfocitos T se midió el día 3 mediante citometría de flujo como una dilución de CFSE en células CD8+/PI- con divisiones celulares. Después de 3 días, el 75 % de los linfocitos T pulsados con TDB frente a HER2 y las células diana habían experimentado una división celular como se muestra en la figura 95A. El número de linfocitos T inducidos por TDB frente a HER2 se sometió a ensayo marcando linfocitos T CD8+ purificados con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554). Se incubaron linfocitos T CD8+ marcados con CFSE con células diana en presencia o ausencia de TDB durante 19 horas. Se recogieron linfocitos T, se lavaron y se cultivaron durante 2 a 7 días (RPMI+10 % FBS). Mediante FACS se detectó el número de células CD8+ vivas (CD8+/PI-) y el porcentaje de células oscuras CFSE. En la figura 95B, el número de células no incrementó. La suplementación adicional del medio de crecimiento con IL-2 (20 ng/ml) proporcionó una señal de supervivencia a las células CD8+, y se detectó una proliferación robusta de linfocitos T en los linfocitos T, pero solo si estaban expuestos tanto a TDB frente a HER2 como a células diana (figura 95C). Es importante destacar que no se detectó ningún efecto espectador en las células que no expresan la diana en condiciones en las que la mayoría de las células HER2+ en el mismo cultivo fueron destruidas. TDB frente a HER2 indujo la proliferación y la expansión policlonal de los linfocitos T, que puede ser crítico para la amplificación de los linfocitos infiltrantes de tumores.

#### **La actividad de TDB frente a HER2 se correlaciona con el nivel de expresión de HER2 en la célula diana**

Para investigar la relación entre el número de copias diana y la actividad de TDB, se seleccionó un panel de líneas celulares cancerosas con un número predeterminado de receptores HER2 en la membrana celular (Aguilar et al. Oncogene. 18:6050-62, 1999). Los niveles de expresión de la proteína HER2 en una línea celular negativa para HER2 (BJAB LUC), 3 líneas celulares bajas de HER2 (MDA435, MDA231, MCF7) y 3 líneas celulares

amplificadas/sobreexpresantes de HER2 (MD453, SKBR3, BT474) se detectaron mediante inmunolectrotransferencia (figura 96A). Las líneas celulares negativas para HER2, HER2 baja y que sobreexpresan HER2 se incubaron con TDB frente a HER2 y con PBMC efectoras en una proporción de E:T 25:1 durante 26 horas. En este momento, se detectó citotoxicidad usando el ensayo de liberación LDH. La figura 96B muestra que las células amplificadas/sobreexpresantes de HER2 eran significativamente más sensibles a la destrucción mediada por TDB ( $p=0,015$ , prueba t) y se lisaron eficazmente en concentraciones femtomolares a picomolares bajas (CE50 = 0,8-3 pM). Las líneas celulares que expresaban niveles bajos de HER2 fueron significativamente menos sensibles al anticuerpo TDB frente a HER2 (CE50 = 33-51 pM). Tan solo <1000 copias del antígeno diana fueron suficientes para favorecer la destrucción de los linfocitos T.

Para los estudios realizados en las figuras 96C-96D, la línea celular MCF7 o la línea celular BJAB se dirigieron conjuntamente con células SKBR3 en presencia de TDB frente a HER2 en el mismo ensayo de destrucción. En este ensayo, se marcaron células MCF7 o BJAB con CFSE y se mezclaron con SKBR3 y PBMC (E:T 20:1) seguido de un tratamiento de 19 horas con TDB frente a HER2. Las células se tiñeron con APC y PI anti-HER2. La figura 96C muestra el porcentaje de SKBR3 (HER2 alto, PI-) y células MCF7 (CFSE+, PI-) vivas detectadas por FACS y normalizadas a microsferas fluorescentes. No se detectó destrucción de células MCF7 en la CE50 para la destrucción de SKBR3. Se muestra el porcentaje de células vivas SKBR3 (HER2 alto, PI-) y BJAB (CFSE+ PI-) detectadas por FACS y normalizadas a microsferas fluorescentes. No se detectó una destrucción significativa de células BJAB en ninguna concentración de TDB frente a HER2 (figura 96D).

#### Una ocupación objetivo muy baja es suficiente para la actividad de TDB

A continuación, se calculó la ocupación de HER2 en CE50 para TDB frente a HER2 usando la fórmula  $[D]/([D]+K_D)$  (donde D = fármaco y  $K_D$  para TDB frente a HER2 fue 5,4 nM). El número de copia de HER2 se informó anteriormente (Aguilar et al. Oncogene. 18: 6050-6062, 1999). Los valores de CE50 se calcularon a partir de los datos de respuesta a la dosis en la figura 97B. La figura 96E muestra que en todas las líneas celulares sometidas a prueba menos del 1% de ocupación diana fue suficiente para una destrucción eficaz. En el caso de las líneas celulares con alta expresión de HER2, la ocupación requerida fue incluso menor (0,01-0,05%). El número absoluto calculado de TDB frente a HER2 unido a HER2 en la CE50 fue tan bajo como 10-150 en las líneas celulares de baja expresión. Estos resultados muestran la potencia extrema de TDB frente a HER2 y son consecuentes con estudios sobre la activación de TCR, que sugieren que se necesitan tan solo entre 1 y 25 TCR para desencadenar respuestas de linfocitos T (Irvine et al. Nature. 419: 845-849, 2002; Purbhoo et al. Nature Immunology. 5: 524-530, 2004; Sykulev et al. Immunity. 4: 565-571, 1996). La potencia de TDB frente a HER2 estuvo consecuentemente en el intervalo bajo picomolar a femtomolar. Además, tan solo entre 10 y 500 TDB unidos a HER2 fueron suficientes para inducir una citotoxicidad *in vitro*. Tan solo ~1000 copias de HER2 en la membrana plasmática fueron suficientes para inducir la destrucción. Estos estudios también demostraron una correlación entre los niveles de expresión diana y sensibilidad a TDB frente a HER2 *in vitro*.

#### TDB frente a HER2 es eficaz para destruir células cancerosas HER2+ refractarias a los tratamientos anti-HER2

A continuación, líneas celulares que previamente se ha demostrado que expresan altos niveles de HER2 pero que son insensibles a los efectos celulares directos de trastuzumab y lapatinib *in vitro* fueron examinados (Junttila et al., Cancer Cell, 15:429-40, 2009; Junttila et al. Breast Cancer Res Treat, 2010). Para algunas líneas celulares, la activación de la vía PI3K debido a mutaciones activadoras adquiridas en la subunidad catalítica PI3K (KPL4, HCC202) o por pérdida de PTEN (HCC1596) puede causar resistencia. Se sometió a ensayo la liberación de LDH en un panel de seis líneas celulares (5 de mama, 1 de pulmón) como medida de citotoxicidad en presencia de PBMC efectoras en una proporción de 10:1 y TDB frente a HER2 durante 19 horas. La CE50 para la destrucción mediada por TDB frente a HER2 estaba en el intervalo femtomolar o picomolar bajo (figura 97A). Los clones BT474-M1 originales y resistentes a T-DM1 se trataron con T-DM1 durante 3 días. En este momento, la viabilidad celular se midió usando CELLTITERGLO® (figura 97B). La sensibilidad de las líneas celulares a T-DM1 se ha informado previamente (Junttila et al. Breast Cancer Res Treat. 2010; Lewis Phillips et al. Cancer Research. 68: 9280-9290, 2008). En comparación, los clones BT474-M1 originales y resistentes a T-DM1 se trataron con TDB frente a HER2 en presencia de linfocitos T CD8+ efectoras en una proporción de 3:1 durante 24 horas. La citotoxicidad se detectó usando el ensayo FACS (figura 97C). Además, TDB frente a HER2 fue eficaz para destruir las células de cáncer de pulmón HER2+. Usando dos modelos de líneas celulares independientes KPL4 y BT474 (figura 97B-97C), la resistencia adquirida a T-DM1 no afectó la sensibilidad a TDB frente a HER2.

El reclutamiento de la actividad de destrucción de linfocitos T con TDB frente a HER2 depende de la expresión de HER2, pero es independiente de la vía de señalización de HER2, lo que sugiere que TDB frente a HER2 puede ser eficaz en el tratamiento de tumores refractarios a los tratamientos anti-HER2 actuales. De acuerdo con esto, los datos demostraron una actividad igual en el tratamiento de múltiples líneas celulares resistentes a trastuzumab/lapatinib en comparación con células sensibles. La resistencia en estas células se genera por diversos mecanismos que afectan la vía HER2. Los datos presentados aquí sugieren que cambiar a un mecanismo de acción alternativo mediante el uso de TDB frente a HER2 puede permitir en términos generales superar la resistencia a los conjugados anticuerpo-fármaco (por ejemplo, T-DM1), inhibidores de moléculas pequeñas

dirigidas (por ejemplo, lapatinib) y anticuerpos monoclonales terapéuticos que bloquean la señalización de vía (por ejemplo, trastuzumab).

#### **Farmacocinética de TDB frente a HER2 en rata**

Para evaluar el perfil farmacocinético (FC) de TDB frente a HER2, se utilizaron ratas Sprague-Dawley. Los animales se separaron en los dos grupos siguientes: Grupo 1: TDB frente a HER2 (10 mg/kg, única i.v., n = 4); grupo 2: trastuzumab (10 mg/kg, única i.v., n = 4). Se tomaron muestras de 4 ratas por grupo en puntos temporales hasta 35 días después de la dosis. Se recogieron aproximadamente 0,2 ml de sangre completa por medio de la vena yugular (bajo anestesia CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>). Las muestras se dejaron coagular y se centrifugaron bajo refrigeración (5°C durante 10 minutos a 2000 x g) para obtener suero. Las muestras de suero se analizaron para detectar IgG humana mediante ELISA, donde se usó anti-huFc de burro recubierto en una placa de microvaloración para capturar los anticuerpos anti-HER2 humanizados en circulación y anti-huFc-HRP de cabra (adsorbido en ratón) para la detección. Los parámetros FC se determinaron con un procedimiento de 2 compartimentos (modelo 7) usando WINNONLIN®, versión 5.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). TDB frente a HER2 no presenta reacción cruzada con CD3 de rata o HER2 de rata y mostró una disposición bifásica típica de una IgG1 con una fase de distribución corta y una fase de eliminación lenta (figura 98). Tanto la eliminación como la semivida de TDB frente a HER2 fueron similares a los de trastuzumab y dentro del intervalo esperado de una IgG1 típica en ratas.

#### **TDB frente a HER2 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones inmunocomprometidos**

La eficacia *in vivo* de TDB frente a HER2 se sometió a prueba en ratones NOD-SCID, que carecen de linfocitos T y B funcionales endógenos y tienen niveles reducidos de tipos de células NK, DC y macrófagos. En este experimento, ratones NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/J, Jackson Labs West) se les implantaron gránulos de estrógeno de liberación sostenida de 0,36 mg durante 60 días (Innovative Research of America) de 1 a 3 días antes de la inoculación de las células, por vía subcutánea sobre el flanco opuesto de la inoculación del tumor. El día 0, se inyectaron 5×10<sup>6</sup> células MCF7-neo/HER2 solas o conjuntamente con 10 x 10 PBMC humanas no estimuladas de uno de los dos donantes sanos (PBMC 1, 2) en HBSS-matrigel en los 2/3 de la almohadilla de grasa mamaria derecha. Los ratones inoculados se dividieron en los cinco grupos siguientes: Grupo 1: Vehículo (TDB de control, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=5-10); grupo 2: PBMC(1) (PBMC (1) + control TDB, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=5-10); grupo 3: PBMC (1) + TDB frente a HER2 (PBMC (1) + TDB frente a HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=5-10); grupo 4: PBMC(2) (PBMC (2) + control TDB, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=5-10); y grupo 5: PBMC (2) + TDB frente a HER2 (PBMC (2) + TDB frente a HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=5-10). Los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. Los volúmenes de tumores de ratones individuales y los volúmenes de tumores ajustados de los grupos de tratamiento se presentan en la figura 99A, donde TDB frente a HER2 impidió el crecimiento de tumores que expresan HER2.

La dependencia de TDB frente a HER2 de las PBMC humanas se sometió a prueba más a fondo en un modelo similar de ratón inmunocomprometido. De nuevo, se inyectaron 5×10<sup>6</sup> células MCF7-neo/HER2 solas o conjuntamente con 10×10<sup>6</sup> PBMC humanas no estimuladas de un donante sano (PBMC 3) en HBSS-matrigel en los 2/3 de la almohadilla de grasa mamaria derecha, y los primeros tratamientos se administraron 2 horas después de la inoculación. En la figura 100A, los ratones inoculados se dividieron en los dos grupos siguientes: Grupo 1: Sin tratamiento (n=7); grupo 2: TDB frente a HER2 (TDB frente a HER2, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., a partir del día 0, n=7). En la figura 100B, los ratones inoculados se dividieron en los tres grupos siguientes: Grupo 1: Sin tratamiento (n=7); grupo 2: PBMC(3) (PBMC(3) + vehículo, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=7); grupo 3: PBMC(3) + control TDB (PBMC(3) + control TDB-2C11, 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=7). Las mediciones del volumen tumoral resultantes no revelan ningún efecto sobre el crecimiento tumoral en animales de control tratados con TDB.

#### **TDB frente a HER2 provoca la regresión de grandes tumores mamarios en ratones transgénicos huHER2**

Para modelar la actividad de TDB frente a HER2 en ratones inmunocompetentes, se usaron ratones transgénicos MMTV-huHER2 humanos (Finkle et al. Clinical Cancer Research. 10: 2499-2511; 2004), y se generó un TDB frente a HER2 sustituto que comprende un clon de anticuerpo reactivo IgG2A CD3 murino 2C11 (Leo et al. Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. 84: 1374-1378, 1987) para evitar la respuesta inmunitaria hacia el TDB. Para la expresión como mulgG2a, mutaciones equivalentes de botón en ojal (Atwell et al. J Mol Biol. 270: 26-35, 1997) se introdujeron en la región Fc, así como D265A y N297G (numeración EU) para abolir la función efectora. En los TDB frente a HER2 mulgG2a, el brazo de "botón" es hu4D5 anti-HER2 murino y el "ojal" es anti-CD3 2C11 murino quimérico (Leo et al. Proc Natl Acad Sci USA. 84: 1374-1378, 1987) (TDB 2C11/hu4D5) o anti-hu CD3 SP34 de ratón (Pessano et al. The EMBO Journal. 4: 337-344, 1985) (TDB SP34/hu4D5). Los anticuerpos biespecíficos mulgG2a se expresaron en células CHO y se ensamblaron mediante ensamblaje *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos se purificaron de los contaminantes mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) como se describe en otra parte (Speiss et al. Nat Biotechnology. 31: 753-758, 2013). El material resultante se analizó para determinar los niveles de endotoxinas usando un sistema de prueba portátil ENDOSAFE® (Charles River, USA) y, según fue necesario, el contenido de endotoxinas se redujo lavando la proteína con TRITON™ X-114 al 0,1 %. La actividad *in*

*vitro* de hu4D5/2C1 1-TDB fue similar a la de TDB frente a HER2 reactivo a CD3 humano (figura 101).

En las figuras 99B-99D, los animales transgénicos MMTV-huHER2 con tumores mamarios establecidos se dividieron en los dos grupos siguientes: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 5, i.v., comenzando el día 0, n=7); y grupo 2: TDB frente a HER2 (TDB frente a HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, i.v., comenzando el día 0, n=7). La figura 99B muestra que se detectó regresión en el 57 % de los ratones y el 43 % de los ratones no tenían ningún tumor detectable después del tratamiento. La figura 99C muestra que TDB frente a HER2 (2C11/hu4D5) dio como resultado una regresión tumoral de más del 50 %, con la excepción de un tumor. Los casos que respondían al tratamiento incluyeron tumores que eran >1000 mm<sup>3</sup> al inicio del tratamiento como se observa en la figura 99D. En un experimento similar se utilizaron dos TDB de control donde uno es un TDB de control del brazo frente a CD3, uno con el brazo frente a CD3 específico murino cambiado al brazo frente a CD3 específico humano (TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5)) y uno es un TDB de control, uno que comparte el mismo brazo frente a CD3 que TDB frente a HER2 (2C11/hu4D5) pero tiene un brazo frente a diana irrelevante (CTRL TDB-2C11). En la figura 99E, los animales transgénicos MMTV-huHER2 con tumores mamarios establecidos se dividieron en los dos grupos siguientes: Grupo 1: TDB de control del brazo frente a CD3 (TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 5, i.v., comenzando el día 0, n=5); y grupo 2: TDB de control (TDB-2C11 de control, 0,5 mg/kg, qwk x 5, i.v., comenzando el día 0, n=5). El crecimiento de los tumores transgénicos MMTV-huHER2 no se vio afectado por los TDB de control.

El TDB frente a HER2 fue sometido a prueba adicionalmente para determinar la eficacia *in vivo* en ratones transgénicos huCD3. Se han descrito previamente ratones transgénicos CD3ε humanos ((huCD3 transgenicos), de la Hera et al. J Exp Med. 173: 7-17, 1991). En este estudio, se inyectaron por vía subcutánea 0,1 millones de células CT26-HER2 en ratones transgénicos huCD3. Una vez establecidos los tumores CT26-HER2, los animales se dividieron en los dos grupos siguientes: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=7); grupo 2: TDB frente a HER2 (TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=7). TDB frente a HER2 inhibió el crecimiento de tumores establecidos, pero el efecto fue transitorio y no se observaron respuestas completas (figura 99F). El estudio demostró la potente actividad *in vivo* de TDB frente a HER2, incluyendo respuestas dramáticas en ratones transgénicos MMTV-huHER2.

En un experimento similar, la eficacia *in vivo* del TDB frente a HER2 reactivo en ratón (2C11/hu4D5) se sometió a prueba en ratones Balb/c. Nuevamente, se establecieron tumores singénicos en ratones Balb/c inyectando 1×10<sup>5</sup> células CT26-HER2 por vía subcutánea. Los animales portadores de tumores se dividieron en uno de los cuatro grupos siguientes: Grupo 1: Vehículo (0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=10); grupo 2: TDB frente a HER2 (TDB frente a HER2 (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=10); grupo 3: TDB de control (CTRL TDB (2C11/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=10); y grupo 4: TDM-1 (TDM-1, 15 mg/kg, qwk x 3, i.v., comenzando el día 0, n=10). La figura 99G muestra que a pesar de las respuestas incompletas, TDB frente a HER2 prolongó significativamente el tiempo hasta la progresión del tumor (valor p de rango logarítmico < 0,0001). Por el contrario, el TDB de control con un brazo tumoral irrelevante no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor. Además, los tumores eran insensibles a TDM-1.

#### **TDB frente a HER2 inhibe el crecimiento de tumores establecidos en ratones inmunocompetentes**

Ratones transgénicos CD3ε humanos (de la Hera et al. J Exp Med. 173: 7-17, 1991) se usaron para modelar la actividad de TDB frente a HER2 en ratones inmunocompetentes. En este experimento, se extrajeron linfocitos T transgénicos huCD3 de bazo de ratones transgénicos huCD3 y BALB/c o de la sangre periférica de donantes humanos sanos. Las células se tiñeron con CD8 de ratón o humano y CD3 humano (clon UCHT1) en la figura 101A o CD3 de ratón (clon 2C11) en la figura 101B. Las células CD8+ se detectaron mediante citometría de flujo. La figura 101A muestra linfocitos T transgénicos huCD3 que expresan CD3 humano a aproximadamente el 50% del nivel de linfocitos T humanos, y la figura 101B muestra linfocitos T transgénicos huCD3 que expresan CD3 murino a aproximadamente el 50% del nivel de ratones BALB/c.

A continuación, se sometió a ensayo la capacidad de los linfocitos T transgénicos huCD3 para destruir células diana CT26 humanas que expresan HER2 *in vitro*. En este estudio, se extrajeron linfocitos T del bazo de ratones transgénicos huCD3, ratones BALB/c o de sangre periférica de donantes humanos sanos. La actividad de destrucción *in vitro* de células CT26-HER2 se sometió a prueba usando TDB frente a HER2 específico de CD3 humano (UCHT1v9/hu4D5) en la figura 102A o TDB frente a HER2 específico de CD3 de ratón (2C11/hu4D5) en la figura 102B. Se agregaron linfocitos T efectores en una proporción de 20:1 a las células diana en presencia del TDB frente a HER2 designado durante 40 horas. La citotoxicidad *in vitro* se controló mediante citometría de flujo. Aunque la actividad de destrucción de los linfocitos T esplénicos de ratón (CE50 = 2,4 ng/ml) fue consistentemente menor en comparación con los linfocitos T periféricos humanos (CE50 = 0,4 ng/ml), los linfocitos T transgénicos huCD3 destruyeron las células diana que expresan HER2 humano *in vitro* como se ve en la figura 102A. El TDB frente a HER2 (2C11/hu4D5) específico de ratón indujo la destrucción de células diana por linfocitos T de ratones transgénicos huCD3 (CE50 = 11 ng/ml) y BALB/c (CE50 = 10 ng/ml) como se ve en la figura 102B.

La dependencia de los linfocitos T de la actividad antitumoral de TDB frente a HER2 se sometió a ensayo adicionalmente en un modelo de tumor singénico. Como se describe anteriormente, se inyectaron 1×10<sup>5</sup> células

CT26-HER2 por vía subcutánea en ratones BALB/c. Los ratones con tumores establecidos se dividieron en uno de los dos grupos siguientes: Grupo 1: Vehículo (n=10); grupo 2: TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5) (TDB frente a HER2 (SP34/hu4D5), 0,5 mg/kg, qwx3, i.v., n=10). La figura 103 muestra que la actividad de TDB frente a HER2 dependía de los linfocitos T, ya que TDB frente a HER2 no tuvo efecto en ratones transgénicos no huCD3. Este estudio demostró que los ratones transgénicos huCD3 se pueden usar como un modelo de eficacia novedoso para las moléculas dirigidas a huCD3.

#### Ejemplo 6. Generación y caracterización de TDB frente a CD3/LYPD1 ejemplares (TDB frente a LYPD1)

También exploramos la capacidad de los anticuerpos TDB para reclutar las actividades citotóxicas de los linfocitos T para erradicar las células tumorales mediante el reconocimiento de un antígeno de superficie celular diferente, LYPD1. Para este fin, generamos y caracterizamos anticuerpos anti-CD3 biespecíficos que tienen un brazo anti-CD3 y un brazo anti-LYPD1 (TDB frente a LYPD1). Los anticuerpos TDB frente a LYPD1 se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato botón en ojal como IgG1 humana, como se describe previamente (Atwell et al. J. Mol Biol. 270: 26-35, 1997). Los semianticuerpos se expresaron en células de *E. coli* o bien de ovario de hámster chino (CHO), se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A y los pares de semianticuerpos apropiados se hibridaron *in vitro* como se describe previamente (Spiess *et al.* Nat. Biotechnol. 2013). Si la producción del anticuerpo TDB se llevó a cabo en células CHO, el anticuerpo puede incluir una mutación de aglucosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (por ejemplo, N297G), de tal manera que el anticuerpo TDB fuera una variante sin efector y que no pudiera iniciar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Después de su hibridación, los anticuerpos TDB anti-CD79b/LYPD1 se purificaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y se caracterizaron por filtración analítica en gel, espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida. El brazo anti-LYPD1 usado en la generación de TDB frente a LYPD1 fue de un anticuerpo anti-LYPD1 YWO.49.H6 que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 272 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 273. Los brazos anti-CD3 sometido a prueba en la generación de TDB frente a LYPD1 incluyeron UCHT1v9, 40G5, SP34 y 38E4v1.

Se sometió a prueba la unión de los TDB frente a HER2 específicos a linfocitos T CD8+ (unión a CD3), así como su actividad, evaluado por ensayos de citotoxicidad y ensayos de activación de linfocitos T *in vitro*.

#### A. Afinidad de unión

Las afinidades de unión para cada una de las TDB frente a LYPD1 se sometieron a prueba mediante análisis por FACS, como se describe anteriormente para las TDB frente a CD20. En resumen, para ensayos de unión por FACS, se incubaron linfocitos TCD8+ con diversas concentraciones de anticuerpos TDB frente a LYPD1 a 4 °C durante 30 minutos, a continuación, las células se lavaron e incubaron con el 2.º anticuerpo (anti-hulgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran de nuevo y estuvieran listas para el análisis por FACS. La figura 104 muestra los resultados de ensayos de unión de TDB frente a LYPD1 por FACS *in vitro*. Los estudios de unión mostraron que los TDB frente a LYPD1 que tenían UCHT1v9 o 38E4v1 como brazo anti-CD3 demostraron una mayor afinidad de unión por las células efectoras resultantes.

#### 8. Ensayos de destrucción de célula diana OVCAR3.Luc y de activación de linfocitos T *in vitro*

También se sometió a prueba la capacidad de los TDB frente a LYPD1 generados para respaldar la destrucción de las células diana OVCAR3.Luc que expresan LYPD1 y la activación del efecto citotóxico de los linfocitos T. La citotoxicidad *in vitro* se controló mediante citometría de flujo. Las células diana se marcaron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen, n.º C34554) Las células diana marcadas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) y los linfocitos T CD8+ purificados de PBMC humanas se mezclaron en una proporción de 3:1, con o sin TDB durante 48 horas. Las células se resuspendieron en un volumen igual de PBS + FBS al 2% + EDTA 1 mM + yodo propidio (PI). El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur en formato automatizado. Se contó el número de células diana vivas seleccionando células CFSE+/IP negativas. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como sigue: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB - número de células diana vivas con TDB)/(número de células diana vivas sin TDB) x 100. Como se muestra en la figura 105, los TDB frente a LYPD1 con UCHT1 v9, 38E4v1 o SP34 para su brazo anti-CD3 mostraron resultados robustos *in vitro* para la destrucción de células diana OVCAR3.Luc en comparación con TDB frente a LYPD1 que tiene 40G5 como brazo anti-CD3.

Cuando se sometieron a prueba en los ensayos de activación de linfocitos T, la figura 106 muestra que los TDB frente a LYPD1 con 38E4v1 y, en menor medida, UCHT1 v9 y SP34, para su brazo anti-CD3 fueron capaces de inducir de manera robusta la actividad de los linfocitos T *in vitro*, en comparación con el TDB frente a LYPD1 que tiene 40G5c como brazo anti-CD3. En estos ensayos, se mezclaron células diana y linfocitos T CD8+ purificados en presencia o ausencia de TDB y la activación de los linfocitos T se analizó mediante citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Bioscience, 555634), CD69-PE (BD Bioscience, 555531) y CD107a-Alexa-Fluor647 (eBioscience, 51-1079). De forma alternativa, después de tefir la superficie con CD8-FITC y CD69-PE, las células se fijaron y permeabilizaron con solución Cytofix/CytoPerm (BD Bioscience, 554722)

y se tiñeron intracelularmente con anti-granzima B-Alexa-Fluor647 (BD Bioscience, 560212). La activación de los linfocitos T se evaluó mediante el porcentaje de células CD8+CD69+ y CD8+CD25+.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende un brazo anti-CD3 y un brazo anti-HER2, en el que:
  - 5 (a) el brazo anti-CD3 comprende un primer dominio de unión que comprende:
    - (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:184, en el que el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y
   
10
    - (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185, en el que el dominio VL comprende una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
   
15
  - (b) el brazo anti-HER2 comprende un segundo dominio de unión que comprende:
    - (i) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 270, en el que el dominio VH comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170, y una HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171, y
   
20
    - (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 271, en el que el dominio VL comprende una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172, una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173, y una HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174.
   
25
2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que el primer dominio de unión se une a un epítipo de CD3 que comprende el residuo de aminoácido Glu6, opcionalmente en el que el epítipo de CD3 comprende además uno o más residuos de aminoácido adicionales seleccionados del grupo que consiste en Gln1, Asp2 y Met7.
   
30
3. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 2, en el que el epítipo de CD3 no comprende los residuos de aminoácido Glu5 y/o Gly3.
   
35
4. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer dominio de unión se une a un polipéptido CD3 humano o a un polipéptido CD3 de macaco cangrejero.
   
40
5. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el segundo dominio de unión se une a un epítipo de HER2 en el dominio IV de HER2.
   
45
6. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo biespecífico comprende una mutación del sitio de aglucosilación.
   
50
7. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 6, en el que la mutación del sitio de aglucosilación es una mutación por sustitución en el residuo de aminoácido N297, L234, L235 y/o D265 de acuerdo con la numeración EU.
   
55
8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 7, en el que la mutación por sustitución se selecciona del grupo que consiste en N297G, N297A, L234A, L235A y D265A.
   
60
9. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo biespecífico es:
  - (i) monoclonal, humanizado o quimérico;
  - (ii) un anticuerpo de longitud completa; y/o
  - (iii) un anticuerpo IgG.
10. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo biespecífico comprende dominios constantes de la cadena pesada, en el que los dominios constantes de la cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH1 (CH1<sub>1</sub>), un primer dominio CH2 (CH2<sub>1</sub>), un primer dominio CH3 (CH3<sub>1</sub>), un
   
65

segundo dominio CH1 (CH1<sub>2</sub>), un segundo dominio CH2 (CH2<sub>2</sub>), y un segundo dominio CH3 (CH3<sub>2</sub>), y en el que al menos uno de los dominios constantes de la cadena pesada está emparejado con otro dominio constante de la cadena pesada, en el que:

- 5 (i) los dominios CH3<sub>1</sub> y CH3<sub>2</sub> comprenden cada uno una protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o cavidad en el dominio CH3<sub>1</sub> se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH3<sub>2</sub>; o
- 10 (ii) los dominios CH2<sub>1</sub> y CH2<sub>2</sub> comprenden cada uno una protuberancia o cavidad, y en los que la protuberancia o cavidad en el dominio CH2<sub>1</sub> se puede posicionar en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH2<sub>2</sub>.
11. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 15 12. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 11.
13. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 12.
- 20 14. Un procedimiento para producir el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo el procedimiento cultivar la célula huésped de la reivindicación 13 en un medio de cultivo y recuperar el anticuerpo biespecífico de la célula huésped o del medio de cultivo.
- 25 15. Un inmunocombinado que comprende el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un agente citotóxico.
16. Una composición que comprende el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 17. La composición de la reivindicación 16, en la que la composición comprende además un antagonista de unión al eje PD-1 o un agente terapéutico adicional.
18. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en un procedimiento de tratamiento: (i) tratando o retrasando la progresión de un trastorno proliferativo celular que lo necesite, o (ii) potenciando la función inmunitaria en un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular.
- 35 19. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 18, en el que el trastorno proliferativo celular es un cáncer positivo para HER2.
- 40 20. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 19, en el que el cáncer positivo para HER2 es un cáncer de mama positivo para HER2 o un cáncer gástrico positivo para HER2.
- 45 21. El anticuerpo biespecífico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en el que el anticuerpo biespecífico se une a (a) una molécula CD3 localizada en una célula efectora inmunitaria y (b) una molécula HER2 localizada en una célula diana distinta de la célula efectora inmunitaria.
22. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 21, en el que el anticuerpo biespecífico activa la célula efectora inmunitaria después de la unión a (a) y (b).
- 50 23. El anticuerpo biespecífico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en el que el anticuerpo biespecífico se formula para su administración a un sujeto:
- (i) en una dosificación de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg, 0,1 mg/kg a 10 mg/kg, o 1 mg/kg; o
- 55 (ii) en combinación con la administración de un antagonista de unión al eje PD-1 y/o un agente terapéutico adicional.
24. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 23, en el que el antagonista de unión al eje PD-1 se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de unión a PD-1, un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-L2.
- 60 25. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 23, parte (ii), en el que el antagonista de unión al eje PD-1 es:
- 65 (i) un antagonista de unión a PD-1 seleccionado del grupo que consiste en MDX-1106 (nivolumab), MK-3475 (lambrolizumab) y AMP-224;

- (ii) un antagonista de unión a PD-L1 seleccionado del grupo que consiste en MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI4736; o
- 5 (iii) un antagonista de unión a PD-L2, en el que el antagonista de unión a PD-L2 es un anticuerpo o una inmumoadhesina.
26. El anticuerpo biespecífico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18-25, en el que el anticuerpo biespecífico se formula para su administración en combinación con la administración de un glucocorticoide o un  
10 conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).
27. El anticuerpo biespecífico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18-26, en el que el anticuerpo biespecífico se formula para su administración en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a la vía HER.  
15
28. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 27, en el que uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de trastuzumab, T-DM1 y pertuzumab.
29. El anticuerpo biespecífico para su uso de la reivindicación 28, en el que el agente terapéutico adicional es  
20 trastuzumab.
30. El anticuerpo biespecífico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18-29, en el que el anticuerpo biespecífico se formula para su administración a un sujeto por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implantación, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o  
25 intranasal.
31. El anticuerpo biespecífico para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18-30, en el que el sujeto es un ser humano.
- 30 32. Un kit que comprende:
- (a) la composición de la reivindicación 16 o 17; y
- (b) un prospecto del envase que comprende instrucciones para administrar la composición a un sujeto para tratar o retrasar la progresión de un trastorno proliferativo celular o para potenciar la función inmunitaria en un sujeto que  
35 tiene un trastorno proliferativo celular.



Figura 2A

Clon	ELISA		FACS			Activación de linfocitos T		Isotipo
	Hu-CD3ε/γ/μFc	CD3ε de macaco cangrejero/μFc	Jurkat	PBMC humanas	PBMC de macaco cangrejero	Activación de linfocitos T		
13A3	+	+	+	+	+	débil	IgG2b/k	
19B1	+	+	+	+	+	débil	IgG2b/k	
72H6	+	+	+	+	+	débil	IgG2a/k	
30A1	+	+	+	+	+	débil	IgG1/k	
41D9	+	+	+	+	+	débil	IgG1/λ	
71H7	+	+	+	+	+	débil	IgG1/λ	

Figura 2B

mu IgG	KD para hCD3eg comercial
30A1	0,4 nM
41D9	1,4 nM
13A3	0,6 nM
19B1	0,7 nM
72H6	2,5 nM

Figura 3A

Clon	ELISA		FACS			Activación de linfocitos T		Isotipo
	Repción Anti-CD3e 1-27	Péptido CD3e (K27 de mecabact) canjejero	Jurkat	PBMC humanas	PBMC de ratón congénico	Activación de linfocitos T		
39B7	+	+	+	+	+	+	+	IgG2b/k
27H5	+	+	+	+	+	+	+	IgG2b/k
38E4	+	+	+	+	+	+	+	IgG3/k
127B3	+	+	+	+	+	+	+	IgG3/k
79B7	+	+	+	+	+	+	+	IgG3/k
95A2	+	+	+	+	+	+	+	IgG3/k
40D2	+	+	+	+	+	+	+	IgG2b/k
118G9	+	+	+	+	+	+	+	IgG3/k
18F2	+	+	+	+	+	+	+	IgG2a/k
43H8	+	+	+	+	+	+	+	IgG3/k
32B8	+	+	+	+	+	+	+	IgG3/k
40G5	+	+	+	+	+	+	+	IgG2a/k
21B2	+	+	+	+	+	débil	débil	IgG3/k
24H11	+	+	+	+	+	+	+	IgG2b/k
125A1	+	+	+	+	+	débil	débil	IgG3/k
21A9	+	+	+	+	+	+	+	
Rab17	+	+	+	+	+	+	+	IgG1 de conejo

Figura 3B

IgG	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
127B3	1,30E+05	9,67E-05	7,44E-10
14C7	1,66E+05	3,79E-05	2,28E-10
40D2	1,97E+05	1,11E-04	5,63E-10
79B7	1,52E+05	3,41E-05	2,24E-10
40G5	1,56E+05	2,48E-05	1,59E-10
18F12	1,34E+05	1,59E-05	1,19E-10
38E4	4,41E+05	3,45E-05	7,83E-11
95A2	2,90E+05	1,87E-05	6,44E-11
43H8	2,66E+05	1,23E-04	4,61E-10
118G9	1,79E+05	3,74E-05	2,09E-10
27H5-1	2,34E+05	1,15E-04	4,92E-10
39B7	2,20E+05	7,31E-05	3,31E-10
muSP34	1,61E+05	4,00E-05	2,49E-10

Figura 3C

IgG	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
mu38E4	5,60E+04	5,32E-05	0,95
mu40G5	3,11E+04	2,69E-05	0,86
Rab17	2,86E+04	2,42E-04	8,46



**Figura 4B**

13A3 DIVLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS  
TRESGVPDRFTGSGGTDFTLTISSVQAEDLAVYCKQSYILRTFGGGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 227)

19B1 GIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS  
STRESGVPDRFTGSGGTDFTLTISSVQAEDLAVYCKQSYILRTFGGGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 243)

72H6 EIVLSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS  
TRESGVPDRFTGSGGTDFTLTISSVQAEDLAVYCKQSYILRTFGGGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 241)

30A1 NIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS  
STRESGVPDRFTGSGGTDFTLTISSVQAEDLAVYCKQSYILRTFGAGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 231)

41D9a QAVVTQESALTTSPGGTVILTCRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTSNRAPG  
VPVRFSGSLIGDKAALTTGAQTEDDAMYFCALWYSTHFVFGGGTKVTV  
(SEQ ID NO: 221)

71H7 QAVVTQESALTTSPGGTVILTCRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTSNRAPG  
VPVRFSGSLIGDKAALTTGAQTEDDAMYFCALWYSTHFVFGGGTKVTV  
(SEQ ID NO: 245)

**Figura 4C**

13A3 EVQLQQSGPELVKPGASVRISKASGYTFTSYIHWMKQRPQGQLEWIGWIYPGNVNT  
 KYNEKFKGKATLTADNNSSTANMQLSSLTSEDSAVYFCARNHDYFDYWGQGTLLVSS  
 (SEQ ID NO: 226)

19B1 EVQLQQSGPELVKPGASVRISKASGYTFTSYIHWMKQRPQGQLEWIGWIYPGNVNT  
 KYNEKFKGKATLTADNNSSTANMQLSSLTSEDSAVYFCARNHDYFDYWGQGTLLVSS  
 (SEQ ID NO: 242)

72H6 EVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYSFTSYIHWMKQRPQGQLEWIGWIFPGSDNT  
 KYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARNGNYAMDYWGQGTSVTVS  
 S (SEQ ID NO: 240)

30A1 QVQLKESGPELVAPSQSLSTCTVSGFSLTNYAIHWVRQPPGKGLDWLGVWAGGNTK  
 YNSALMSRLSFSKDNSKQVLEINSLQTDDTAMYVCAREDSGGYVALDYWGQGTSVT  
 VSS (SEQ ID NO: 230)

41D9a QIQLVQSGPELVKPGETVKISKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTNTGK  
 PTYAEFEKGRFVFSLETSASTTYLQINNLKNETATYFCARRGDYRYAWFLYWGQGTLLVT  
 VSA (SEQ ID NO: 220)

71H7 QIQLVQSGPELVKPGETVKISKASGYTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTNTGK  
 PTYAEDEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNETATYFCARRGDYRYAWFTYWGQGTLLVT  
 VSA (SEQ ID NO: 244)

**Figura 5A**

14C7 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIFWASTRYSGVPDRFTGSGGIDFTLTIRSVQPEDLAV  
 YYCTQSYTLRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 247)

127B3 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQTEDLAV  
 YYCCQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 249)

18F12 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQAEELAV  
 YYCKQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 251)

27H5-1 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQAEELAV  
 YYCTQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 253)

36E4 DIVMTQSPSFLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWSTRKSGVPDRFTGSGGIDFTLTISSVQAEELAI  
 YYCKQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 286)

39B7 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQAEELAV  
 YYCKQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 255)

40D2 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIFWASTRESGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQAEELAV  
 YYCKQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 257)

40G5 DIVLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLWYQQKPGQSPKLLIYWASTRDSGVDRFSGSGGIDFTLTISSVQAEELAV  
 YYCTQSYTLRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 292)

79B7 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQTEDLAV  
 YYCCQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 259)

95A2 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRDSGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQPEDLAV  
 YYCTQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 261)

118G9 DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDRFTGSGGIDFTLTISSVQTEDLAV  
 YYCTQSFILRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 263)

**Figura 5B**

14C7 EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGFSFTNYYIHHMKQRPGQGLEIWNIIYPGSDNTKFNDFKFKGKATLTADTSSSTTAYMQLSSL  
 TSEDSAVYYCARDISITNYYFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 246)

127B3 QVQLQQSGSELVIRPGASLKLCKASGYFTSYMMHMRQRPGQGLEIWNIFYPGDLTVNYDEKFNKVTFLAVDTSSSTAFLLQSSL  
 TSEDSAVYYCTRDAYSRYYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 248)

18F12 QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTNYYMHWKQRPGQGLEIWNISPGSGSIKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSL  
 TSEDSAVYYCARDGYSLYFFDFWGGTLLTVSS (SEQ ID NO: 250)

27H5-1 QVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKTSGYSFINYYTHMVKQRPGQGLEIWNIIYPGNGNIKYNEKFMGKATLTADTSSSTAHMHLSSL  
 VSEDSAVYYCARDYSGSYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 252)

38E4 QVQLQQSGPELVKPGASVTISCTASGFTTSYYIHHVRQRPGQGLEIWNIIYPENDNTKYNEKFKDKATLTADTSSSTAYMQLSSL  
 TSEDSAVYYCARDGYSRYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 285)

39B7 QVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKTSGYNFINYYTHMVKQRPGQGLEIWNIIYPGNGNIKYNEKFMGKATLTADTSSSTAHMHLSSL  
 VSEDSAVYYCARDYSGSYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 254)

40D2 QVQLQQSGPELVKPGASLKLCKASGYSFANYTHMVRQRPGQGLEIWNIIYPGNGDTRYNEKFKDKATLTADTSSNTASMQLNSL  
 TSEDSAVYYCTRDSYGNYYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 256)

40G5 QVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKASGYFTNYYIHHVRQRPGQGLEIWNIIYPGDVSTKYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMLLSGL  
 TSEDSAIYFCARDGYSFYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 291)

79B7 QVQLQQSGSELVIRPGASLKLCKASGYFTSYMMHMRQRPGQGLEIWNISYPGDLNWNVDEKFNKVTFLAVDTSSSTAFLLQSSL  
 TSEDSAVYYCTRDAYSRYYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 258)

95A2 QVQLQQSGPEMVKPGASVTISCKTSGFTTSYYIHHMQRPGQGLEIWNIIYPGDVSTRYNEKFRDKATLTADKSSSTAYLYLSSL  
 TSEDSAVYYFCARDSSASYFFDFWGGTLLTVSS (SEQ ID NO: 260)

118G9 QVQLQQSGSELVIRPGASVTLSCASGYSFTSYMMHVKQRPGQGLEIWNIIYPGGEIINYAEKFKTKGTLTVDISSSTAYMHLSSL  
 TSDDSAVYYCTRDTTGNYYFFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 262)

**Figura 6A**

21A9 DIQMTQSPSSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLWVYQQKLGQPPKLLIYRASTR  
ESGVPDRFSGSGGTDFTLTISLSLAEDVAVYYCQQYYSVPWTFGGGTKVEIK  
(SEQ ID NO: 235)

Rab17 DMTQTPSSKSVPGDVTINCQASETWYNNYLAWFQQKPGQPPKRLIYGVSTLDSGVP  
PRFSGSGGTQFTLTISDVVCDDAATYACAGYKTSSSYAIAFGGGTELEIL  
(SEQ ID NO: 265)

**Figura 6B**

21A9 EVQLVESGGGVVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASEKGLEWVGRIRSRANSYA  
TAYAASVKDRFTISRDNKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCIRD<sup>TM</sup>VRGIDYWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 234)

Rab17 QSVKESEGGLFKPTDLILICTVSGCSLSSCAISWVRQAPGKLEWIGFMSVTGSAYAN  
WAKSRSTITRNTNENTVTLKMTRLTAADTAIFYFCARVGIGSGLNIWGGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 264)



# Figura 8A

## Cadena ligera, kappa: Anticuerpo de ratón afinado con K4H1

Número de Kabat: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36  
 K4H1: D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S V L V S N A K M Y L A W Y  
 13A3 (ACD3): D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S V L V S N A K M Y L A W Y  
 Hw13A3 (ACD3): D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S V L V S N A K M Y L A W Y

Número de Kabat: 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71  
 K4H1: Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G T D F  
 13A3 (ACD3): Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G T D F  
 Hw13A3 (ACD3): Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G T D F

Número de Kabat: 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107  
 K4H1: F L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Y Y G T P F T F G C G T K V E I K  
 13A3 (ACD3): F L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Y Y G T P F T F G C G T K V E I K  
 Hw13A3 (ACD3): F L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Y Y G T P F T F G C G T K V E I K

## Cadena pesada: Anticuerpo de ratón afinado con K4H1

Número de Kabat: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35  
 K4H1: E V Q L V Q S G A E Y K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A P Q Q G  
 13A3 (ACD3): E V Q L V Q S G A E Y K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A P Q Q G  
 Hw13A3 (ACD3): E V Q L V Q S G A E Y K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A P Q Q G

Número de Kabat: 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84  
 K4H1: L E W I G W I N P G S G N T N Y A O K F Q A V I T R D T S T A Y L E L S S L R S  
 13A3 (ACD3): L E W I G W I N P G S G N T N Y A O K F Q A V I T R D T S T A Y L E L S S L R S  
 Hw13A3 (ACD3): L E W I G W I N P G S G N T N Y A O K F Q A V I T R D T S T A Y L E L S S L R S

Número de Kabat: 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113  
 K4H1: E D T A V Y C A R R N H D Y Y C A R R N H D Y Y F D Y W G Q G T L V Y V S S  
 13A3 (ACD3): E D T A V Y C A R R N H D Y Y C A R R N H D Y Y F D Y W G Q G T L V Y V S S  
 Hw13A3 (ACD3): E D T A V Y C A R R N H D Y Y C A R R N H D Y Y F D Y W G Q G T L V Y V S S

# Figura 8B

## Cadena ligera, kappa: Anticuerpo de ratón alineado con K4H4

Número de Kabat	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
K4H4	D I V M T Q S P D Q L A V S L G E R A Y I N C K S S Q S V L Y S S N N K N Y L A W Y
30A1 (ACD3)	D I V M T Q S P S L A V S L G E R A Y I N C K S S Q S L L S G R T K N Y L A W Y
Pu30A1 (ACD3)	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K R S S Q S L L S G R T K N Y L A W Y

Número de Kabat	37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71
K4H4	Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R . . . E S G V P D R F S G S G S G T D F
30A1 (ACD3)	Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R . . . E S G V P D R F S G S G S G T D F
Pu30A1 (ACD3)	Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R . . . E S G V P D R F S G S G S G T D F

Número de Kabat	75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
K4H4	T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P . . . F T F G Q G T K V E I K
30A1 (ACD3)	T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P . . . F T F G Q G T K V E I K
Pu30A1 (ACD3)	T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P . . . F T F G Q G T K V E I K

## Cadena pesada: Anticuerpo de ratón alineado con K4H4

Número de Kabat	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44
K4H4	E V Q L V E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S G Q Y Y W S W I R Q P P G K G
30A1 (ACD3)	E V Q L V E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S G Q Y Y W S W I R Q P P G K G
Pu30A1 (ACD3)	E V Q L V E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S G Q Y Y W S W I R Q P P G K G

Número de Kabat	45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84
K4H4	L E W I G Y I Y . . . Y S G S T Y V N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V A
30A1 (ACD3)	L E W I G Y I Y . . . Y S G S T Y V N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V A
Pu30A1 (ACD3)	L E W I G Y I Y . . . Y S G S T Y V N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V A

Número de Kabat	86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134
K4H4	A D T A V Y Y C A R . . . F D Y W G Q G Q G Y L V T V S S
30A1 (ACD3)	A D T A V Y Y C A R E D S S G Y V A . . . F D Y W G Q G T V T V S S
Pu30A1 (ACD3)	A D T A V Y Y C A R E D S S G Y V A . . . F D Y W G Q G T L V T V S S



# Figura 8D

Cadena ligera, lambda: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
10LV7-46*01	Q	A	V	T	Q	E	P	E	S	L	T	V	S	R	R	G	T	V	T	L	T	C	G	S	T	G	A	V	T	S	G	H	Y	D	Y	W	F
muSP24	Q	A	V	T	Q	E	P	E	S	L	T	V	S	R	R	G	T	V	T	L	T	C	G	S	T	G	A	V	T	S	G	H	Y	D	Y	W	F
HumuSP24	Q	A	V	T	Q	E	P	E	S	L	T	V	S	R	R	G	T	V	T	L	T	C	G	S	T	G	A	V	T	S	G	H	Y	D	Y	W	F

Número de Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71		
10LV7-46*01	Q	K	P	Q	A	R	R	T	L	I	D	T	S	N	T	H	S	W	T	P	A	R	F	S	G	S	L	L	G	G	K	A	L	G	G	K	A
muSP24	Q	K	P	Q	A	R	R	T	L	I	D	T	S	N	T	H	S	W	T	P	A	R	F	S	G	S	L	L	G	G	K	A	L	G	G	K	A
HumuSP24	Q	K	P	Q	A	R	R	T	L	I	D	T	S	N	T	H	S	W	T	P	A	R	F	S	G	S	L	L	G	G	K	A	L	G	G	K	A

Número de Kabat	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
10LV7-46*01	A	L	T	L	S	G	A	Q	P	E	D	E	A	E	Y	C	L	S	Y	S	G	A	R	T	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
muSP24	A	L	T	L	S	G	A	Q	P	E	D	E	A	E	Y	C	L	S	Y	S	G	A	R	T	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L
HumuSP24	A	L	T	L	S	G	A	Q	P	E	D	E	A	E	Y	C	L	S	Y	S	G	A	R	T	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L

Cadena pesada: Anticuerpo de ratón alineado con líneas germinales humanas

Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Cadena pesada H3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	S	F	T	F	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G			
muSP24	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	S	F	T	F	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G			
HumuSP24	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	S	F	T	F	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G			

Número de Kabat	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84		
Cadena pesada H3	L	E	W	V	G	A	I	S	S	G	S	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	M	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A
muSP24	L	E	W	V	G	A	I	S	S	G	S	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	M	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A
HumuSP24	L	E	W	V	G	A	I	S	S	G	S	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	M	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A

Número de Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
Cadena pesada H3	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	T	L	I	S	T	L	I	S	F	D	T	W	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	I	G	H	D	10H04					
muSP24	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	T	L	I	S	T	L	I	S	F	D	T	W	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	I	G	H	D	10H04					
HumuSP24	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	T	L	I	S	T	L	I	S	F	D	T	W	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	I	G	H	D	10H04					



# Figura 8F

## Cadena ligera, kappa: Anticuerpo de ratón alineado con K4H1

Número de Kabat: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36  
 K4H1 D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S V L Y S S N K N Y L A W Y  
 40G5 (xCD3e) D I V Q S P S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L N S F T K N Y L W Y  
 7s40G5 (xCD3e) D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L N S F T K N Y L W Y

Número de Kabat: 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71  
 K4H1 Q Q K P G Q P K L L I Y W A S Y R E S G V P D R F S G S G S G T D F  
 40G5 (xCD3e) Q Q K P G Q P K L L I Y W A S Y R E S G V P D R F S G S G S G T D F  
 7s40G5 (xCD3e) Q Q K P G Q P K L L I Y W A S Y R E S G V P D R F S G S G S G T D F

Número de Kabat: 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107  
 K4H1 Y L Y I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P F T I F G Q G T K Y E I K  
 40G5 (xCD3e) T L Y I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P F T I F G Q G T K Y E I K  
 7s40G5 (xCD3e) T L Y I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P F T I F G Q G T K Y E I K

## Cadena pesada: Anticuerpo de ratón alineado con K4H1

Número de Kabat: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44  
 K4H1 E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A P G Q G  
 40G5 (xCD3e) E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A P G Q G  
 7s40G5 (xCD3e) E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A P G Q G

Número de Kabat: 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84  
 K4H1 L E W I G W I M P G S G N I S Y A Q K F O G R V T I I R D T S T S T A Y L E L S S L R S  
 40G5 (xCD3e) L E W I G W I M P G S G N I S Y A Q K F O G R V T I I R D T S T S T A Y L E L S S L R S  
 7s40G5 (xCD3e) L E W I G W I M P G S G N I S Y A Q K F O G R V T I I R D T S T S T A Y L E L S S L R S

Número de Kabat: 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113  
 K4H1 E C I A V Y Y C A R F D Y W G Q G Y L V T V S S  
 40G5 (xCD3e) E C I A V Y Y C A R F D Y W G Q G T T V S S  
 7s40G5 (xCD3e) E C I A V Y Y C A R F D Y W G Q G T L V T V S S

**Figura 9A**

13A3 murino = 0,7 nM

**Variantes de 13A3 humanizada:**

<u>Cadena pesada</u>	<u>Injerto K4</u>	<u>injerto K4 + S43A</u>
injerto VH1	1,5 nM	1,8 nM
injerto VH1 + R71A	1,0 nM	1,4 nM
injerto VH1 + V37M + V67A + R71A + T73N	0,8 nM	ND
injerto VH1 + V37M + V67A + R71A + T73N + Y91F	1,2 nM	1,4 nM

**Figura 9B**

30A1 murino = 0,4 nM

**Variantes de 30A1 humanizadas:**

<u>Cadena pesada</u>	<u>injerito K4</u>	<u>injerito K4 + S43A</u>
injerito VH3	2,9 nM	1,4 nM
injerito VH3 + A24V	1,7 nM	1,7 nM
injerito VH3 + R71K + L78V	1,8 nM	2,2 nM
injerito VH3 + A24V + R71K + L78V	2,3 nM	1,5 nM
injerito VH3 + A24V + V48L + F67L + I69F + R71K + L78V	2,4 nM	1,4 nM
injerito VH4 + V71K + F78V	15,4 nM	5,7 nM
injerito VH4 + I37V + I48L + V67L + I69F + V71K + F78V	2,4 nM	1,7 nM

## Figura 9C

41D9 murino = 1,1 nM

**Variantes de 41D9 humanizadas:**

Cadena pesada

injerto VH7 + V2I + A78T + Y91F

injerto  $\Lambda$ 7 + F36V + Q38E + A43L + P44F  
+ T46G + Y49G + G69D + Y87F

---

ND

**Figura 9D**

SP34 murino = 7 nM

**Variantes de SP34 humanizadas:**

Cadena ligera      inyecto VH3 inyecto VH3 inyecto VH3 inyecto VH3

	<u>+T93V</u>	<u>+G49A</u> <u>+T93V</u>	<u>+N73D</u> <u>T93V</u>	<u>G49A</u> <u>N73D</u> <u>T93V</u>
inyerto de λ7	+ Y49G		unión débil	14,5 nM
inyerto de λ7 + F36V	+ T46G + Y49G	15,9 nM	3,5 nM	
inyerto de λ7 + F36V + Q38E + A43L + P44F + T46G + Y49G + T58V + Y87F		21 nM	3,1 nM	8 nM
inyerto de λ2	+ Y49G	sin unión		
inyerto de λ2 + A43L + P44F + L46G + M47L + Y49G		unión débil	13 nM	47 nM

## Figura 9E

38E4 murino = 0,75 nM

**Variantes de 38E4 humanizadas:**

Cadena pesada

injerto VH1 + R71A

injerto K4 + P43S

0,5 nM

**Figura 9F**

Las CDR de 40G5c murino se derivaron de una secuencia consenso

**Variantes de 40G5c humanizadas:**

<u>Cadena pesada</u>	<u>injerto K4</u>
injerto VH1 + V67A + R71A	37 nM
injerto VH1 + I69L + R71A	36 nM
injerto VH1 + V67A + I69L + R71A	24 nM

Figura 10

Variantes	hCD3ε <sup>1-27</sup> -Fc (nM)	huCD3εγ (nM)	cyCD3εγ (nM)	hCD3εγ comercial
hu13A3.v2				1
hu30A1.v2				2
hu41D9a				ND
huSP34.v52	11	19	12	4
hu38E4.v1	1,0	0,5	0,7	
hu40G5c	13	12	14	

Figura 11

	Versión	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
38E4	v1	6,06E+06	0,0051	0,8
38E4	v2	2,29E+06	0,0036	1,6
38E4	v3	4,11E+06	0,0140	3,4
38E4	v4	3,25E+05	0,0034	10
<b>40G5</b>	<b>c</b>	<b>1,20E+06</b>	<b>0,01764</b>	<b>15</b>
38E4	v5	2,05E+06	0,0225	11
38E4	v6	5,11E+04	0,0017	34
38E4	v7	2,83E+05	0,0246	87
38E4	v8	1,12E+06	0,2018	180
38E4	v9	7,26E+04	0,0166	229

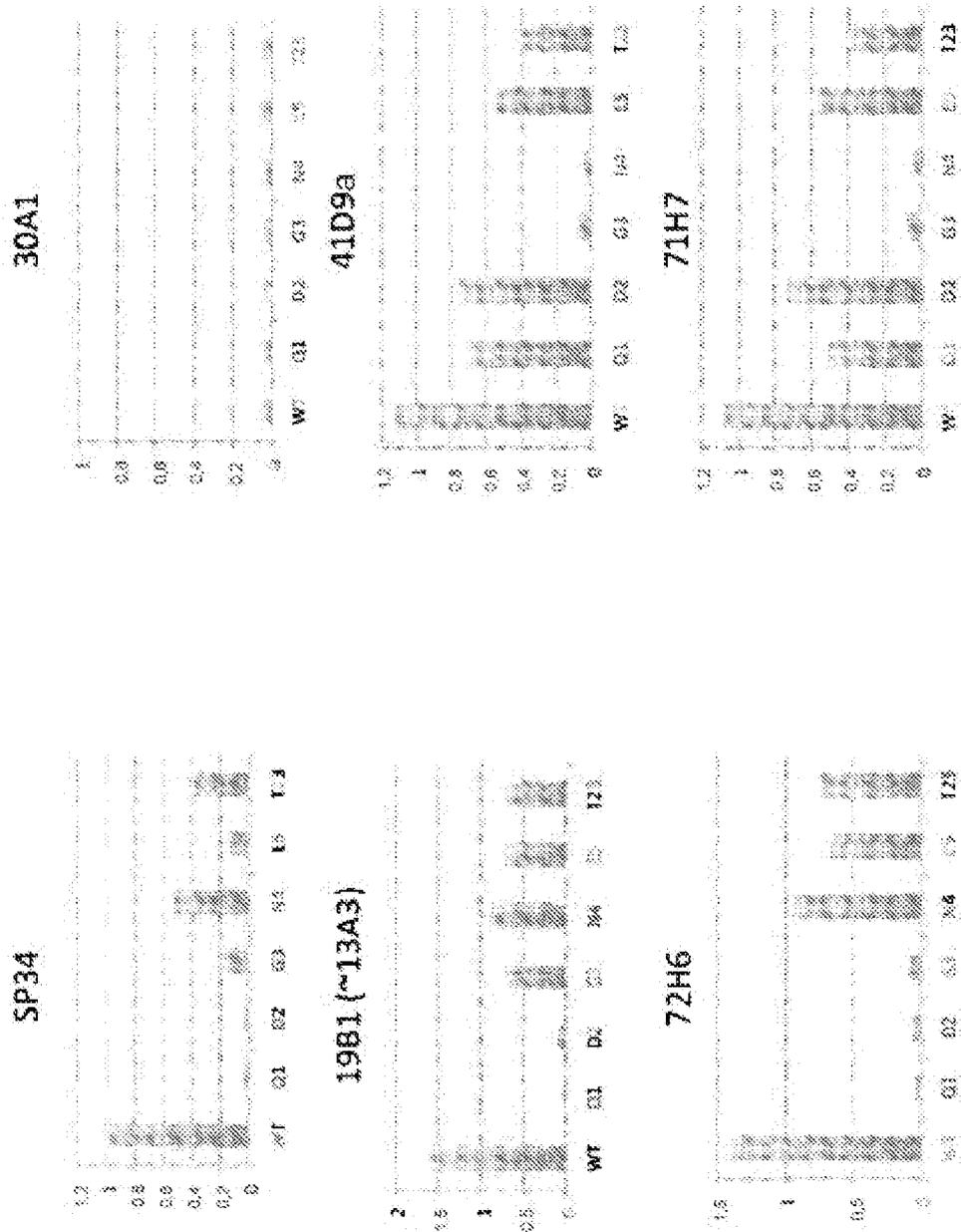
Figura 12A

mutantes de L3	Cinética de ciclo único			Cinética de ciclo completo		
	ka (1/Min)	kd (1/s)	KD (mM)	ka (1/Min)	kd (1/s)	KD (mM)
K89A	4.28E+05	1.02E-03	2.4	1.78E+05	4.22E-03	23.8
Q90A						29.9
S91A	3.44E+05	1.35E-03	3.9	1.46E+06	2.32E-02	15.9
F92A				3.08E+06	1.24E-02	4.0
I93A						5.1
L94A	2.83E+05	2.95E-04	1.0			
R96A			NB			
T97A	2.96E+05	8.60E-04	2.9			
mutantes de H3	ka (1/Min)	kd (1/s)	KD (mM)	ka (1/Min)	kd (1/s)	KD (mM)
R94A	5.55E+04	4.35E-03	78.4			
D95A	1.27E+05	3.09E-03	24.3			
D95T				51140	0.005749	34.2
D95S				1.12E+06	0.2018	179.5
G96A				1.86E+06	3.57E-03	1.9
Y97A			NB			
S98A	3.85E+05	1.47E-03	5.8			
R99A			NB			
Y100A				4.60E+04	1.91E-02	414.5
Y100aA				2.83E+05	2.46E-02	87.0
F100bA			NB			
D101A	1.42E+05	3.42E-03	24.1			
Y102A	3.22E+05	1.32E-03	4.1			
hu38E4.v1	3.20E+05	1.08E-03	3.4			
hu38E4.v1				5.44E+06	4.33E-03	0.8
						1.0

**Figura 12B**

L3	89	90	91	92	93	94	96	97	
	K	Q	S	F	I	L	R	I	
H3			95	96	97	98	99	100	100a
			D	G	Y	S	R	Y	Y
									100b
									F
									101
									D
									102
									Y

Figura 13A



Unión del anticuerpo al péptido: cada IgG a 3 nM. Anticuerpo frente a IgG de ratón secundario-HRP. DO @ 450 nm.

Figura 13B

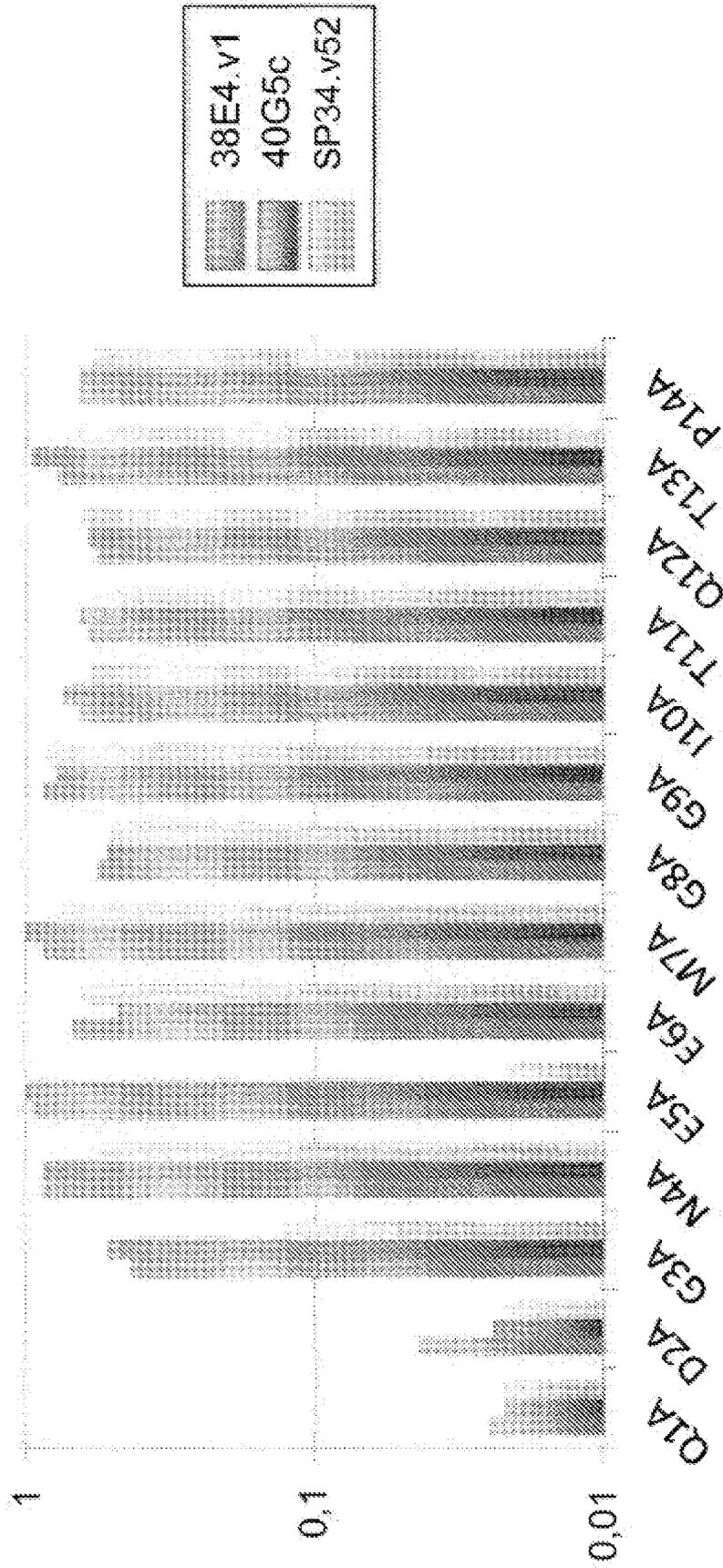


Figura 13C

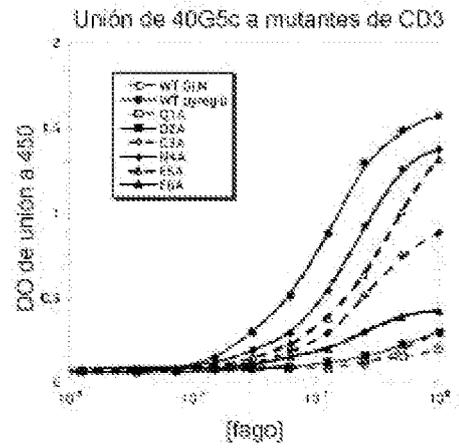
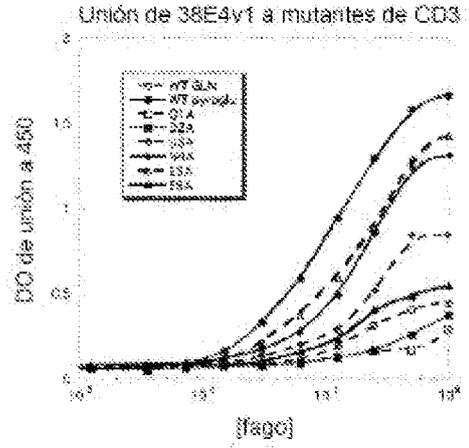
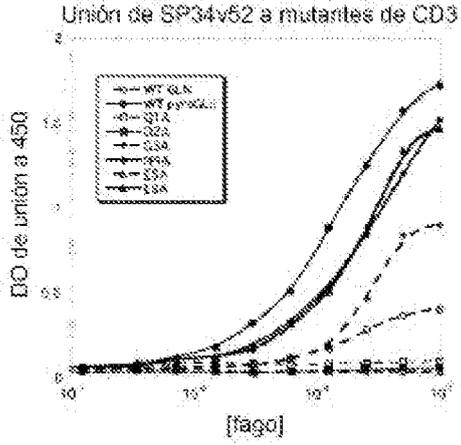


Figura 13D

SP34v52	
KD de afinidad (nM)	
WT	12
Q1A	NB
D2A	NB
G3A	172
N4A	20
E5A	19000
E6A	17
M7A	17
G8A	27
G9A	25

38E4v1	
KD de afinidad (nM)	
WT	3
Q1A	1000
D2A	1500
G3A	7
N4A	3
E5A	7
E6A	65
M7A	13
G8A	8
G9A	6

**Figuras 14A-14F**

A Secuencia peptídica de 16 unidades: piroGlu-D-G-N-E-E-M-G-G-I-T-Q-T-P-Y-K

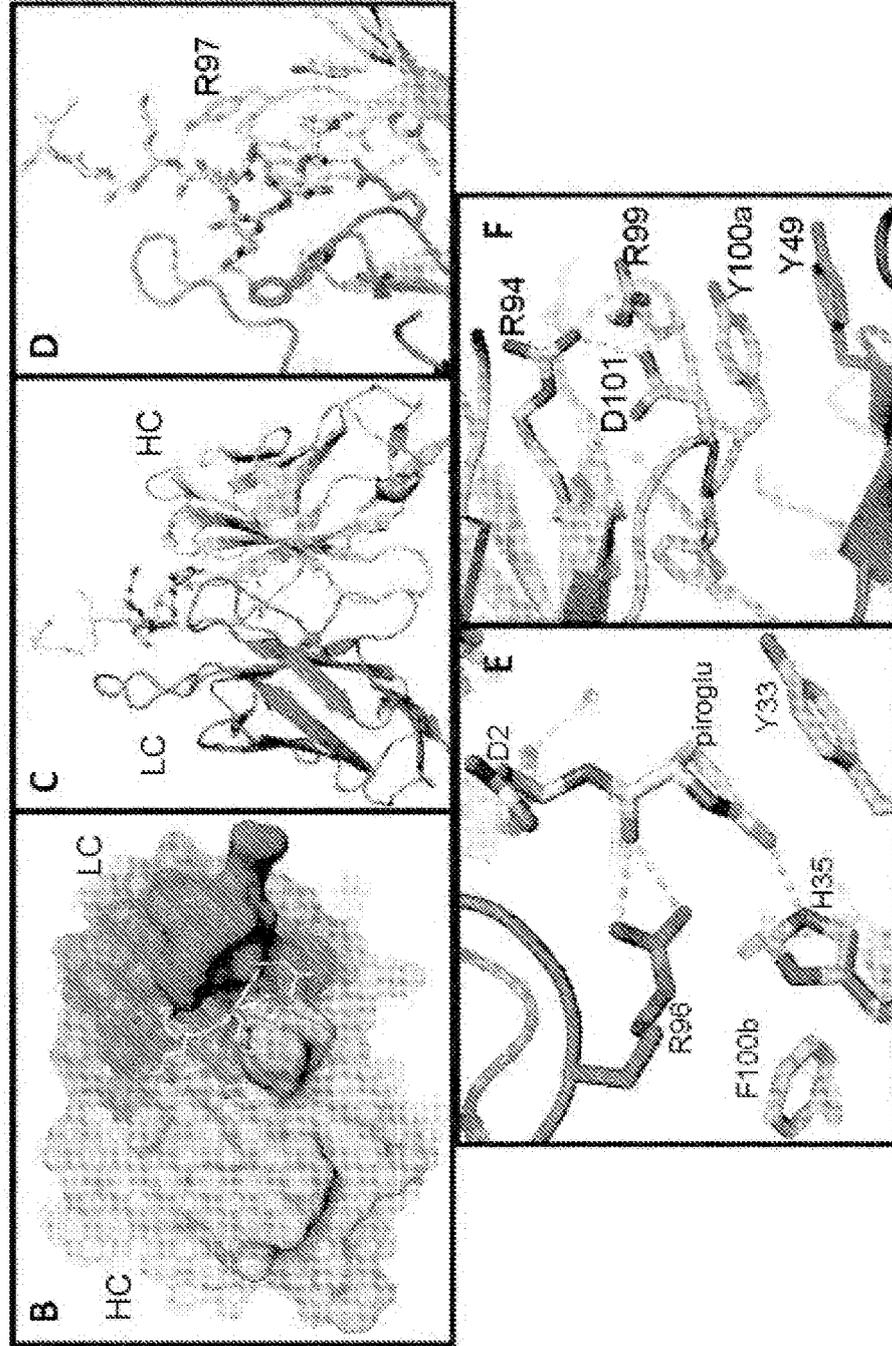
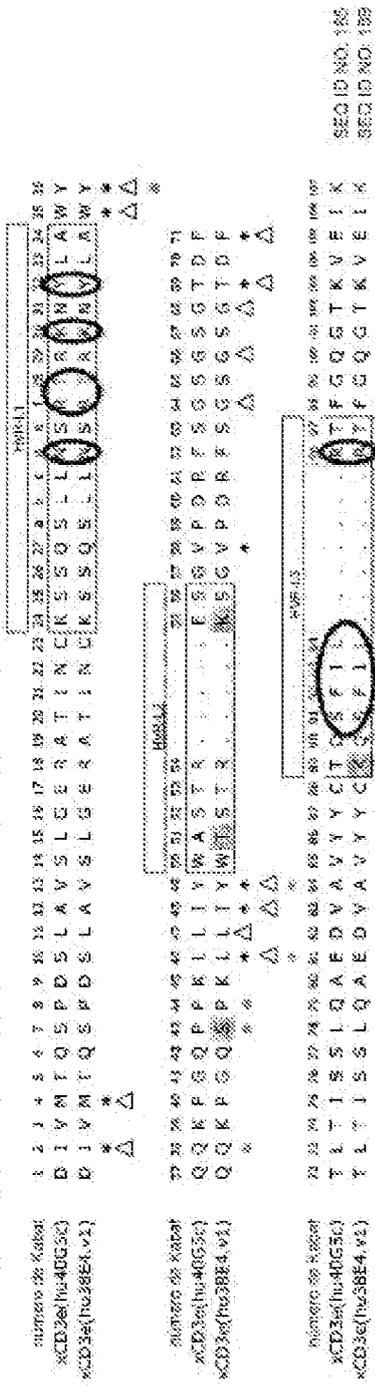
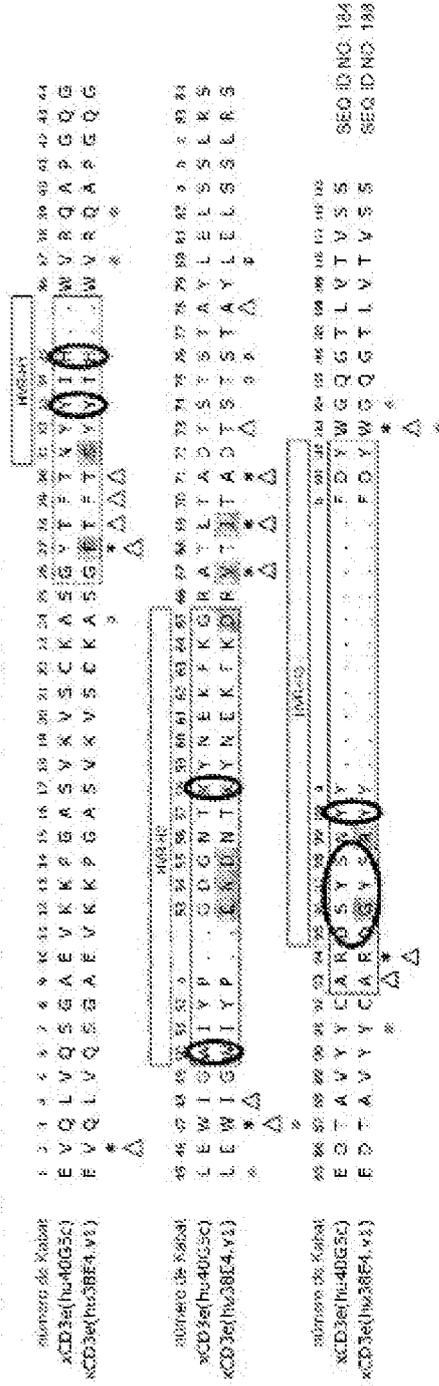


Figura 14G

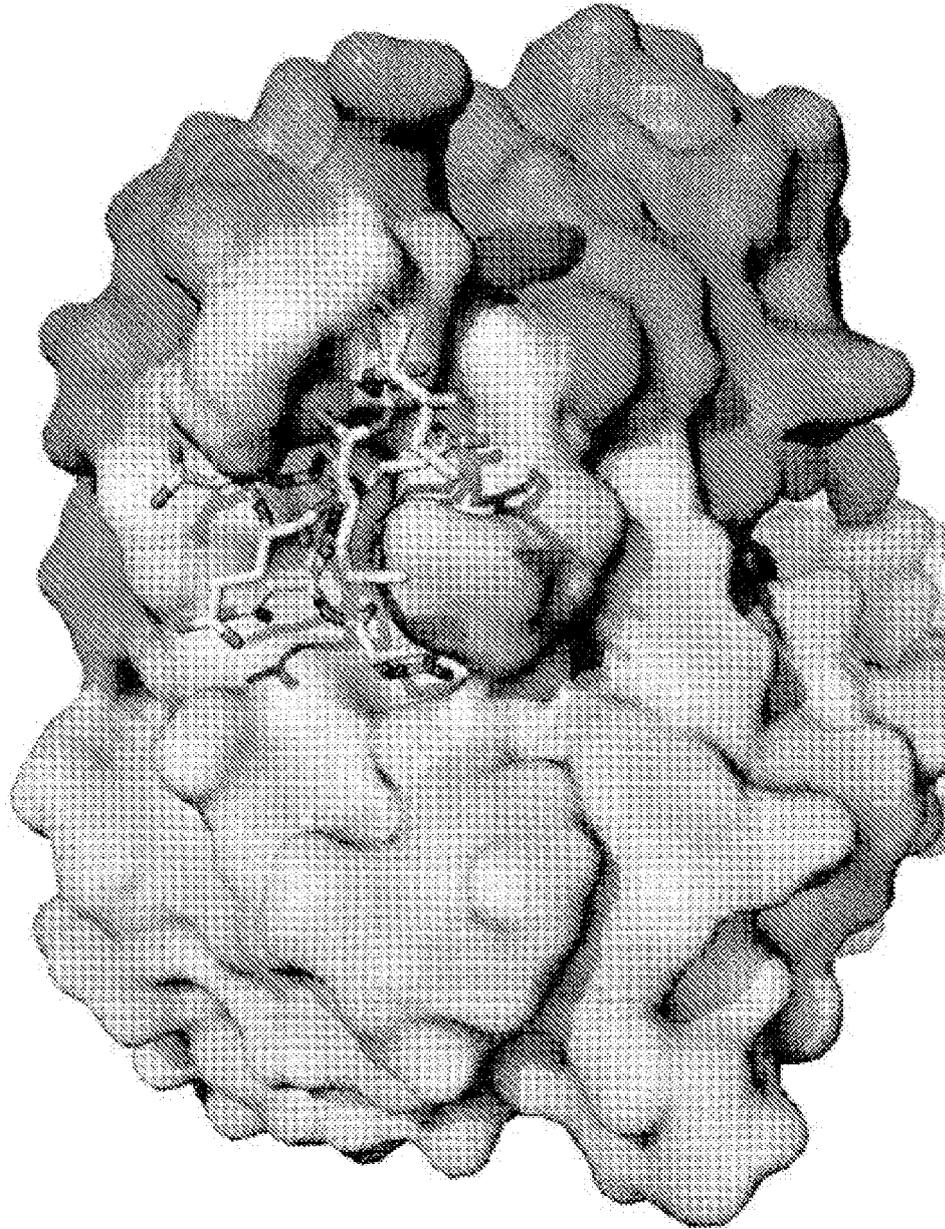
Cadena ligera, kappa: Anticuerpo humanizado alineado con xCD3e(hu40G5c)



Cadena pesada: Anticuerpo humanizado alineado con xCD3e(hu40G5c)

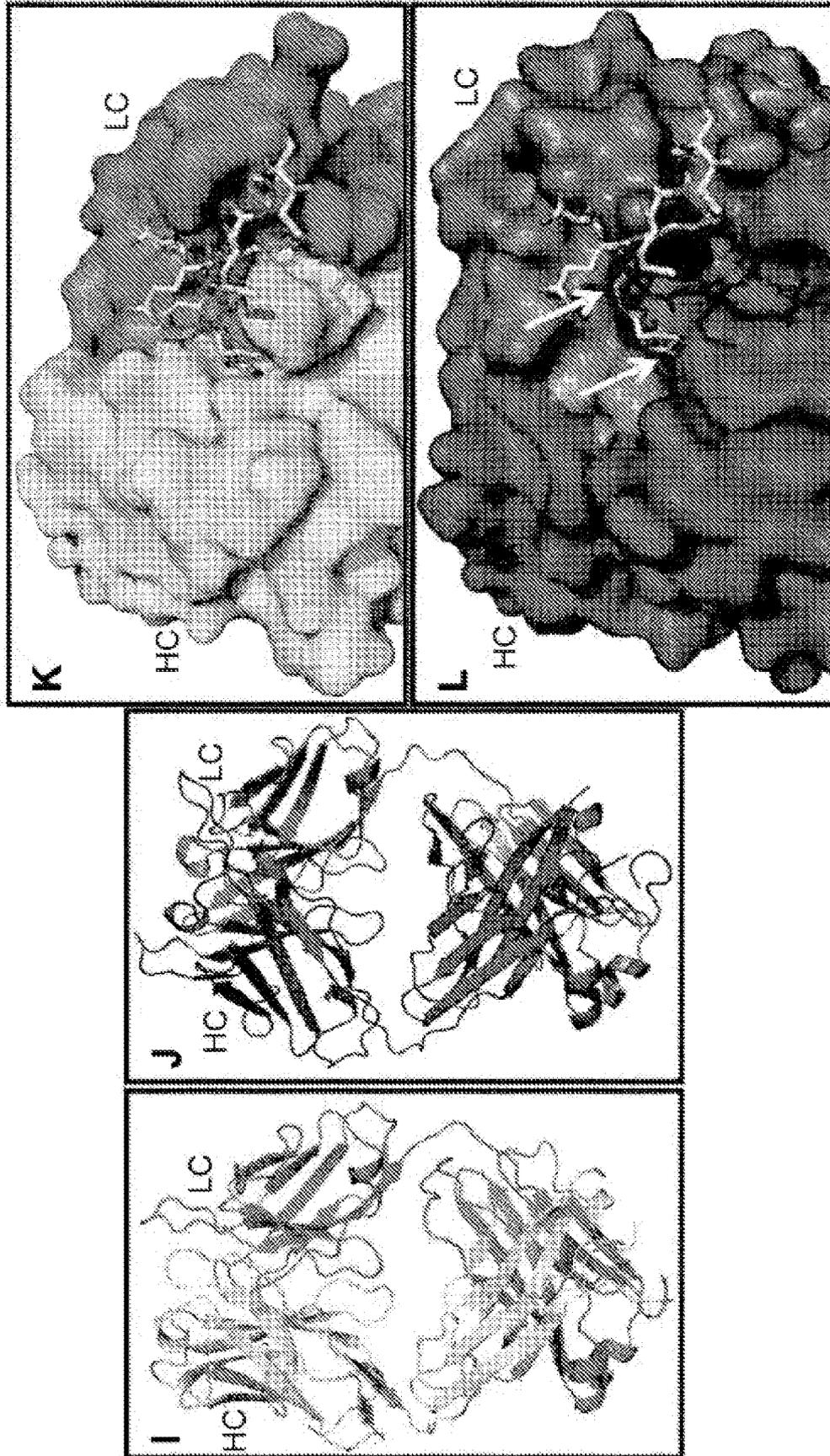


Δ Posiciones de noHo; Farias y Winkler, JMB (1992): 224-287  
 \* Interacciones F19-CDR; Radigan Mol. Immunol. (1994): 31-482  
 \* Interacciones Vh-VL; Pedlar, Mol. Immunol. (1994): 31-168



**Figura 14H**

Figuras 14I-14L



**Figuras 14M-14N**

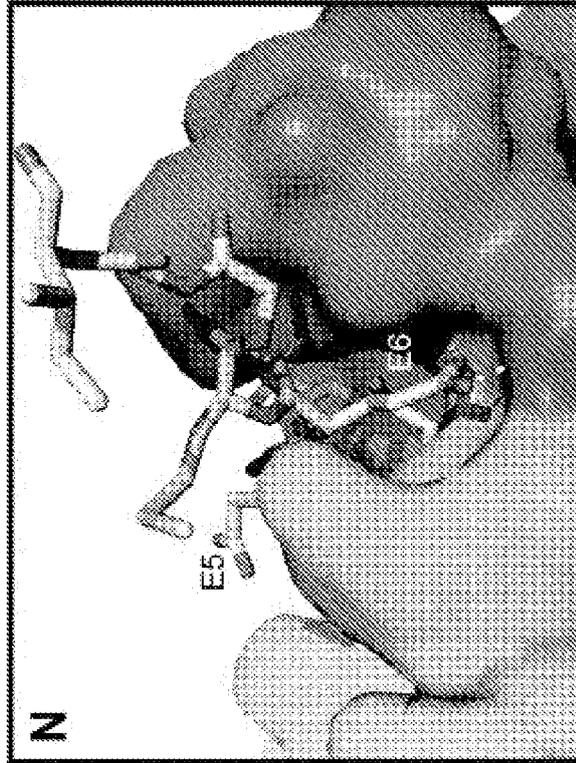
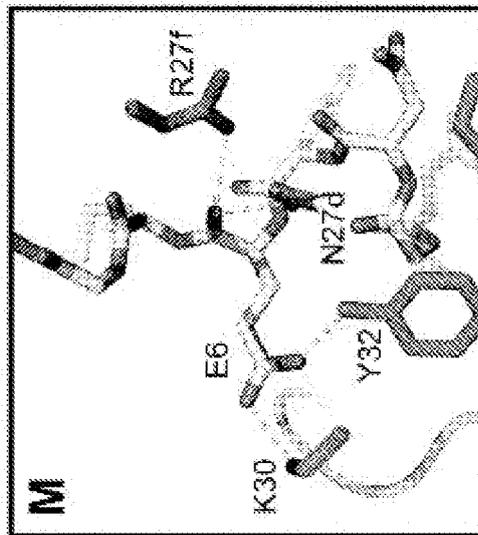


Figura 15

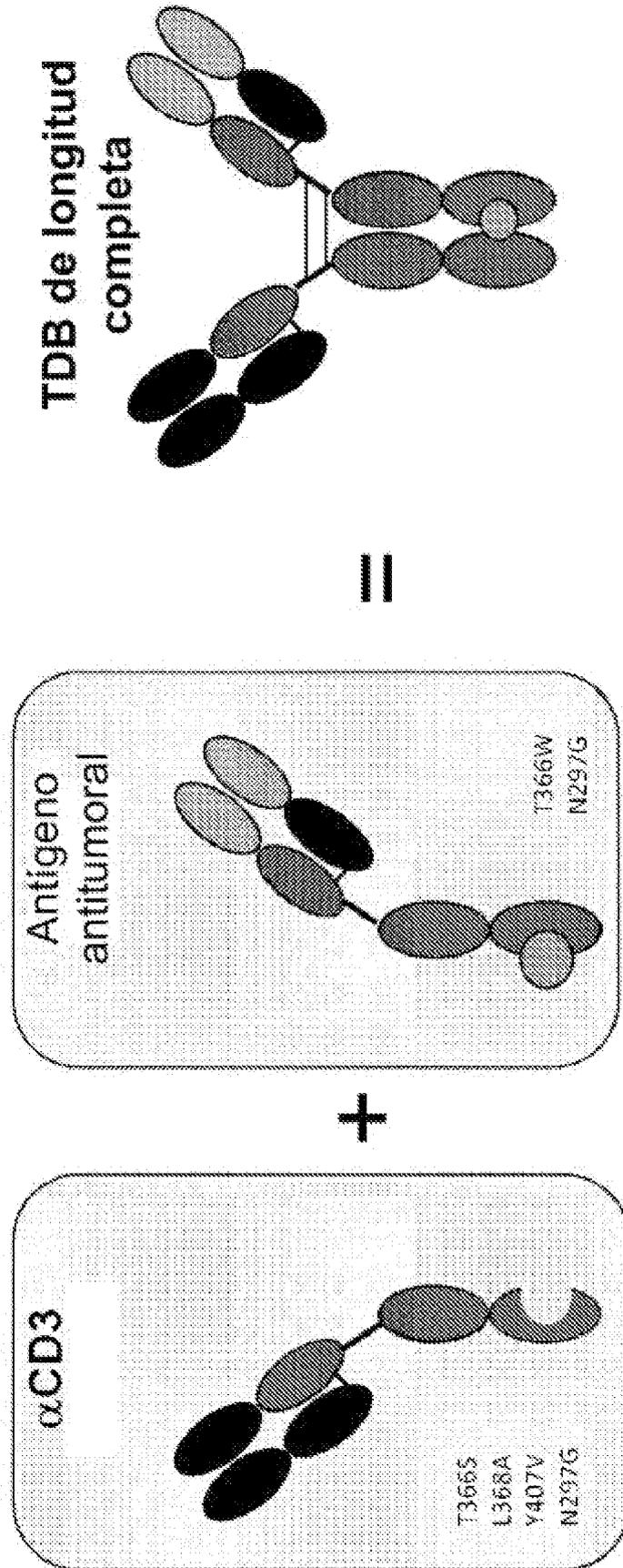
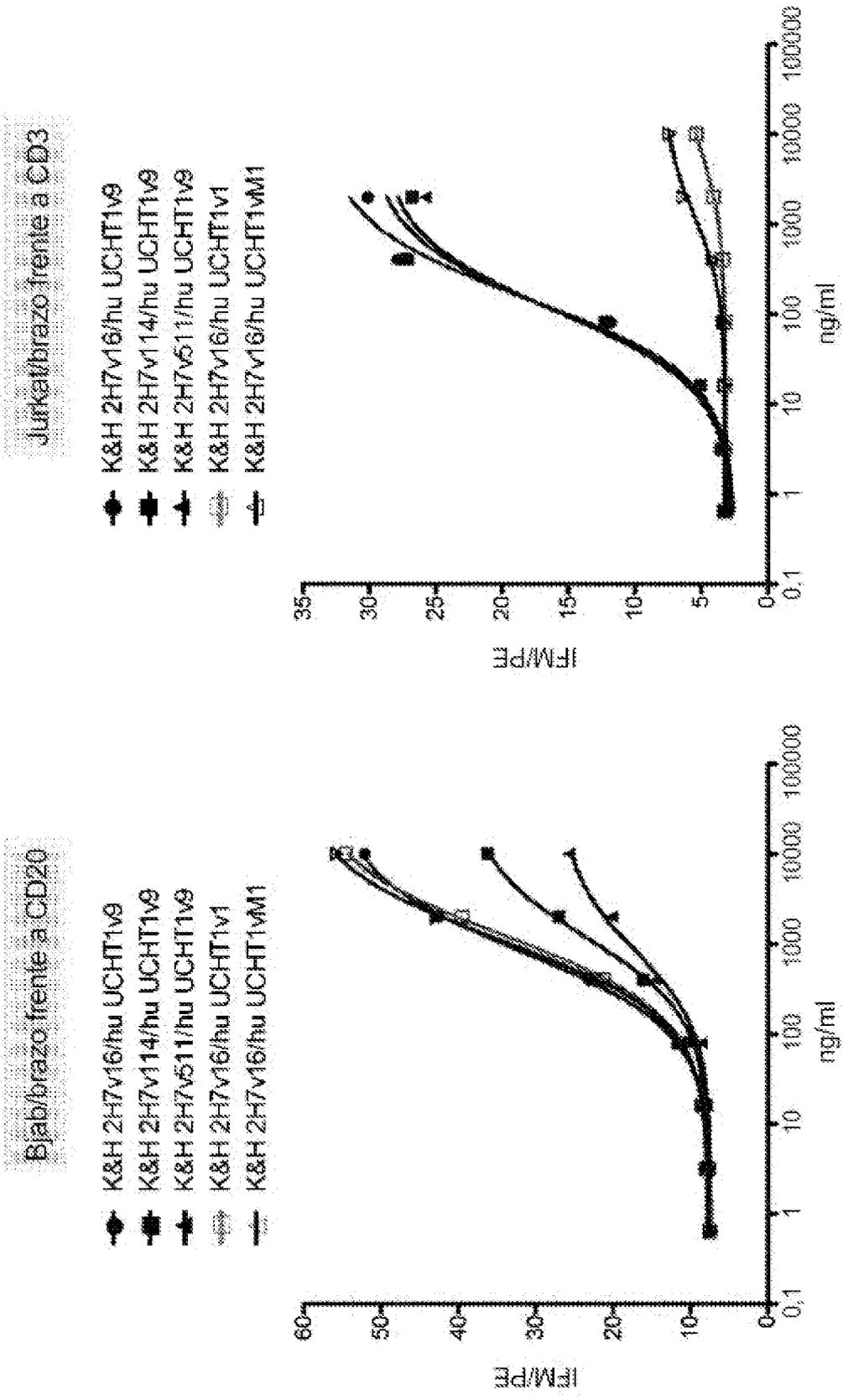


Figura 16



## Figura 17

### Afinidad de unión monovalente

Anticuerpo	anti-CD20/2H7		anti-CD3/UCHT1	
clon	v16	v114	v511	v9
Kd (nM) *	54	44	53	4,2
				318
				vM1
				v1
				NA

\*Kd de unión monovalente medida por scatchard

### Afinidad de unión bivalente

Anticuerpo	anti-CD20/2H7 w/UCHT1v9		anti-CD3/UCHT1 w/2H7v16	
clon	v16	v114	v511	v1
Kd (nM) *	46	4,5	2,3	300
				40
				vM1
				v9
				3

\*Kd de unión monovalente medida por scatchard

Figura 18

Unión del brazo frente a CD3 con células Jurkat

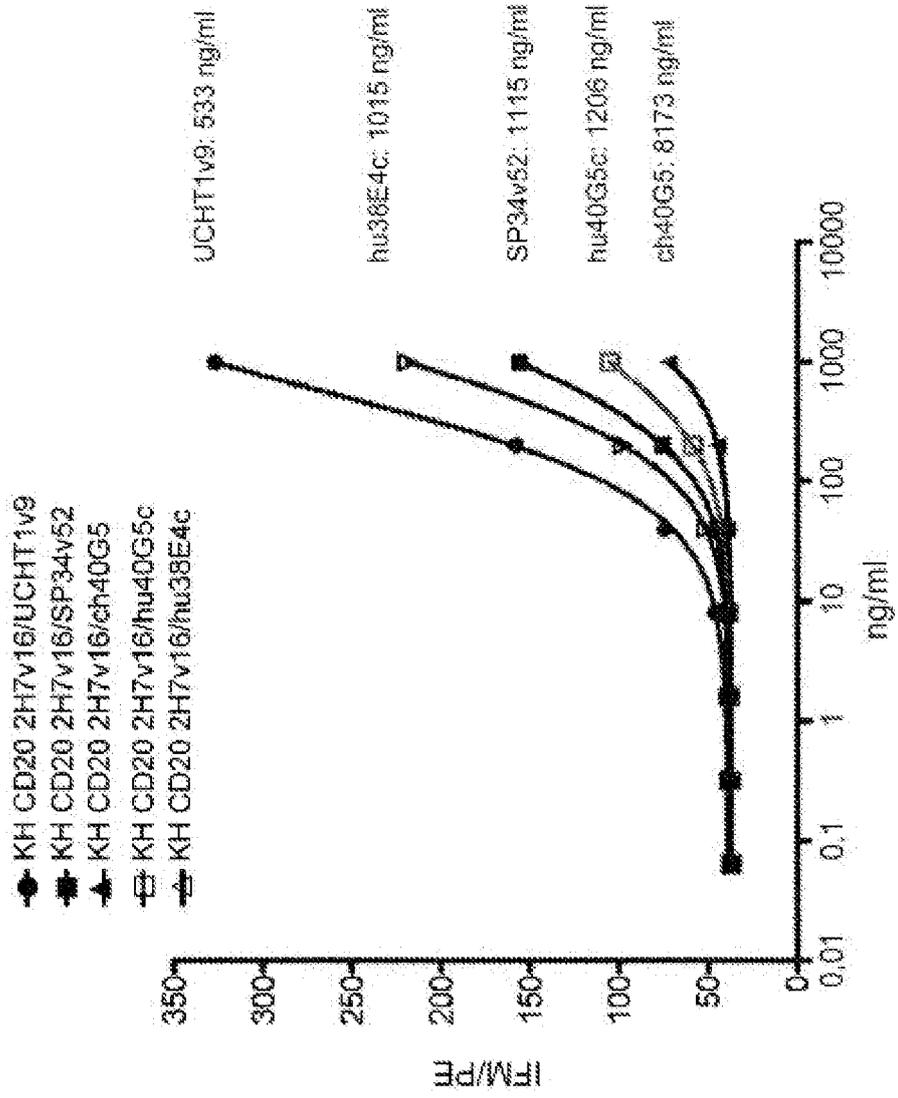


Figura 19

Unión del brazo frente a CD3 con células Jurkat

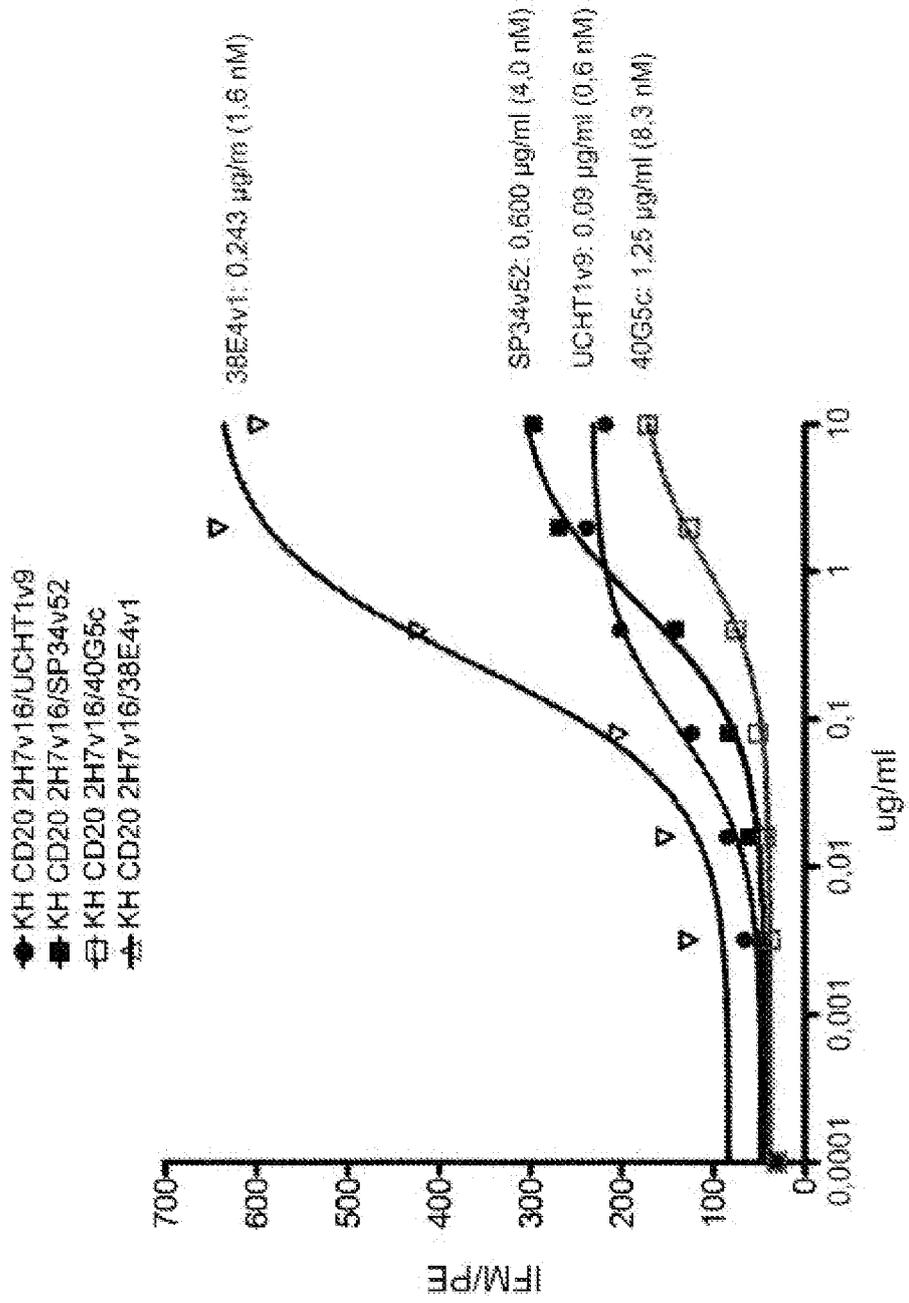
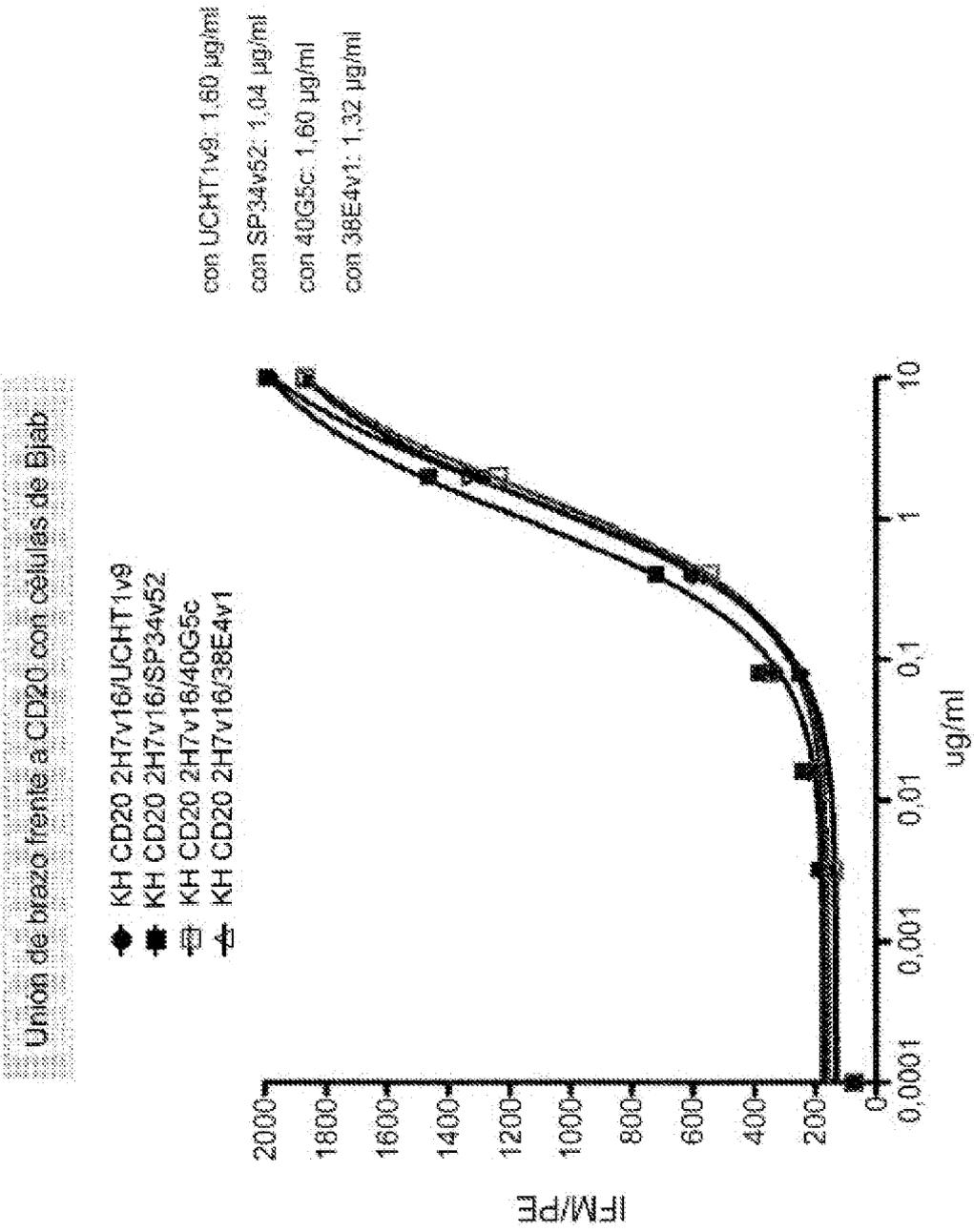
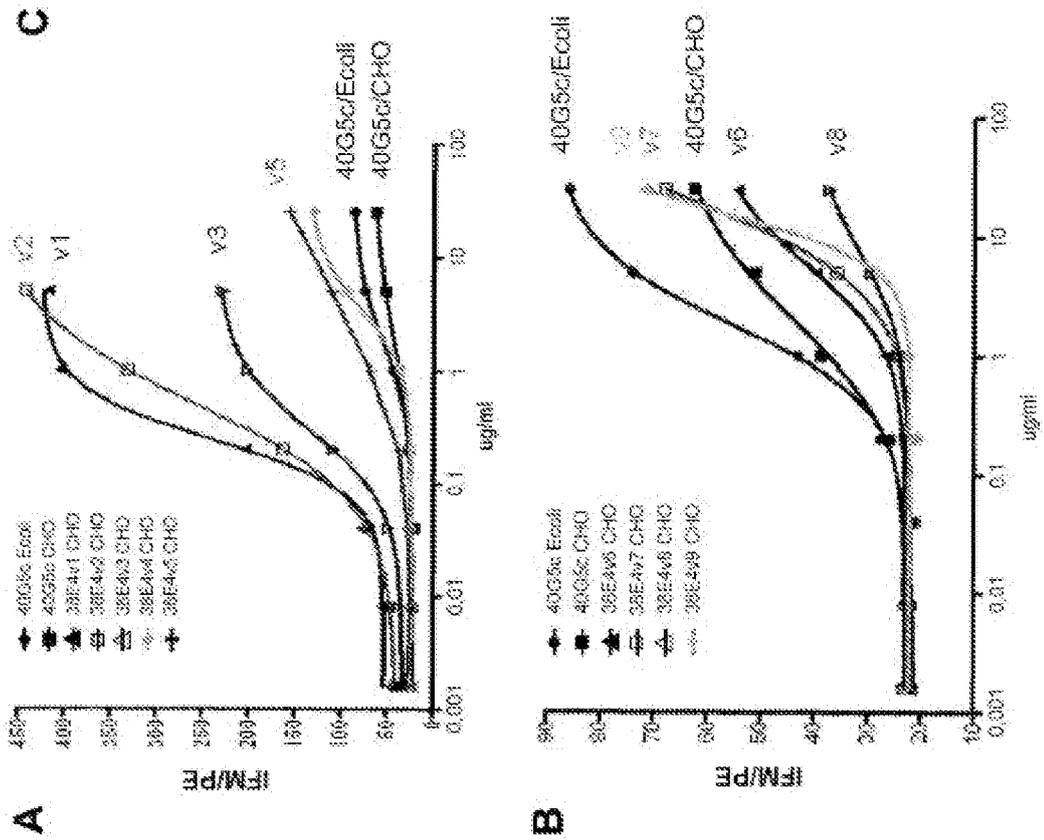


Figura 20



Figuras 21A-21C



Brazo frente a CD3	Fuente	CE50(µg/ml)
40G5c	E. coli	1,85 (~12 nM)
40G5c	CHO	2,01 (~13 nM)
38E4v1	CHO	0,24 (~1,6 nM)
v2	CHO	0,52 (~3,4 nM)
v3	CHO	0,29 (~1,9 nM)
v4	CHO	3,51 (~23 nM)
v5	CHO	4,14 (~27 nM)
v6	CHO	5,56 (~36 nM)
v7	CHO	22,6 (~147 nM)
v8	CHO	7,23 (~47 nM)
v9	CHO	15,0 (~97 nM)

\* Variante de N297G para todo el material de CHO

Figuras 22A-22B

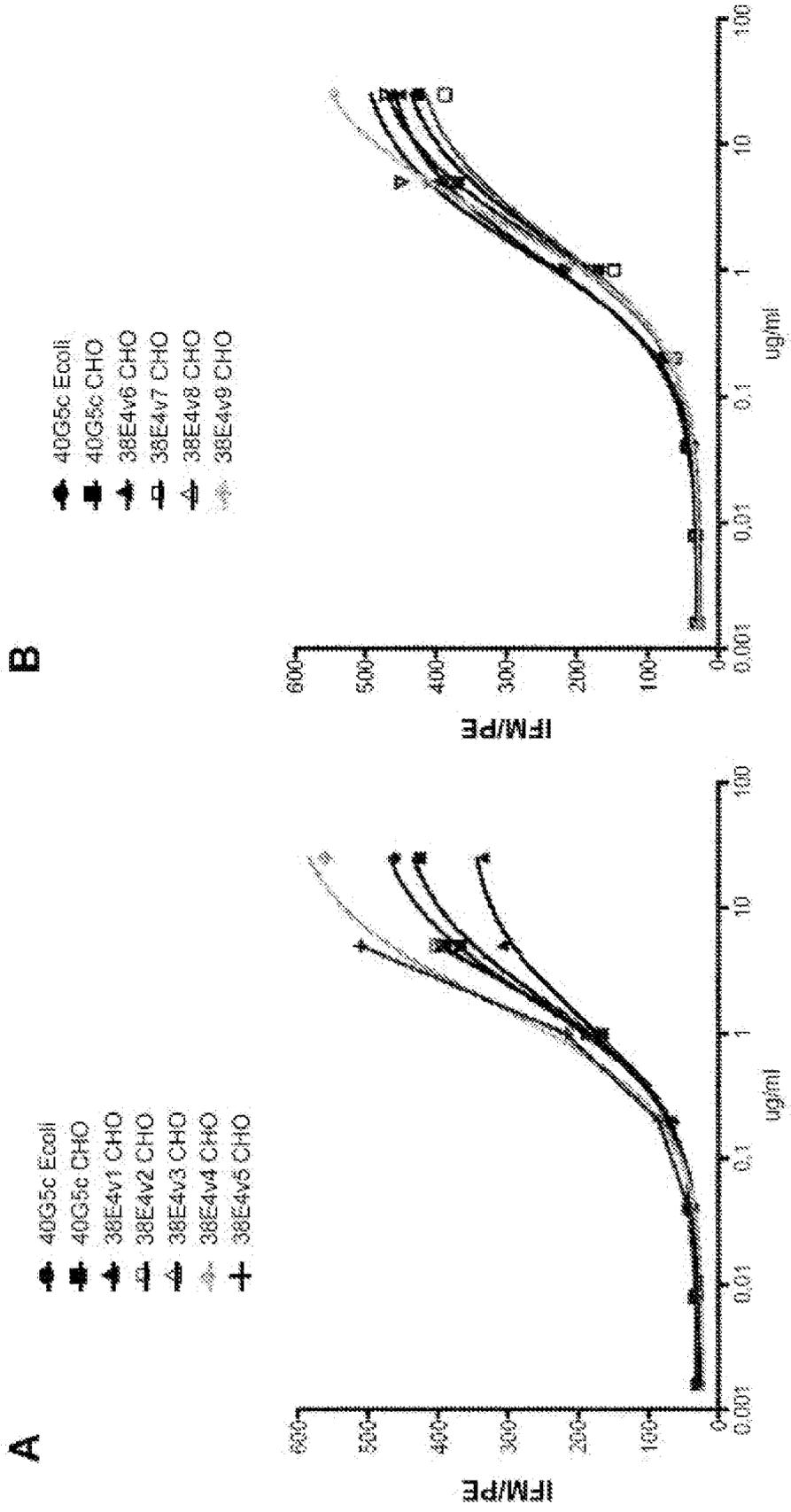


Figura 23

Unión de brazo frente a CD3 con células Jurkat.

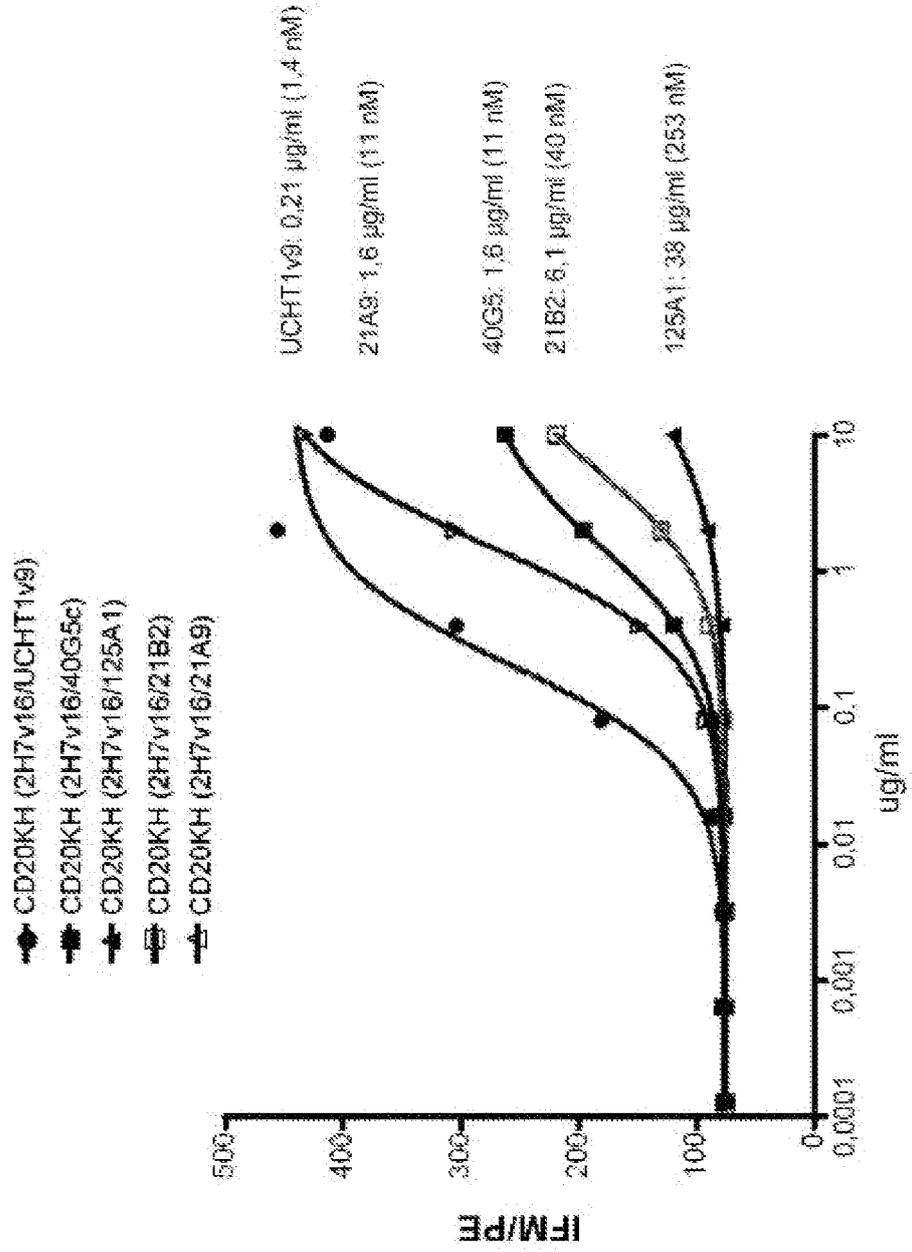


Figura 24

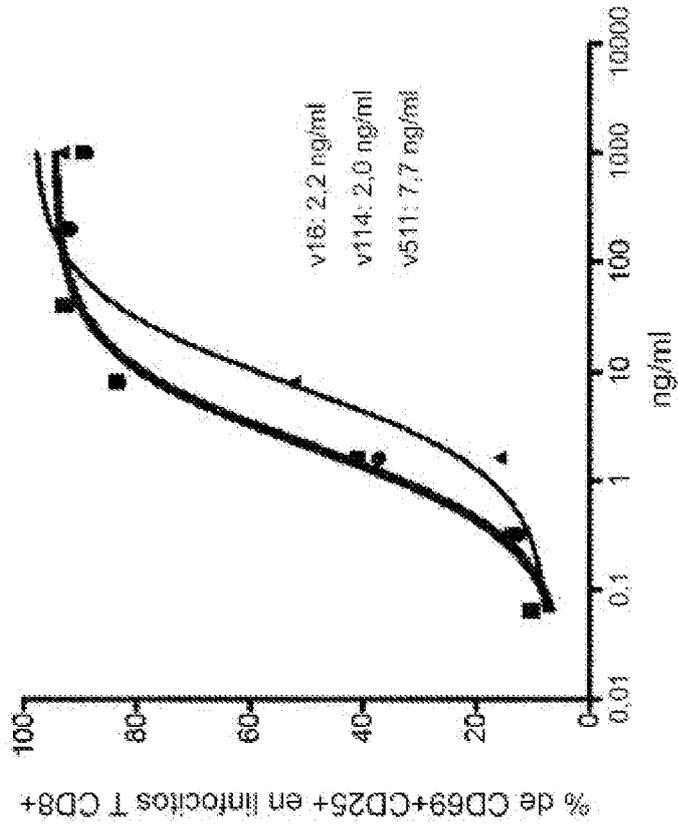
Nombre de muestra	TDR				Fab		
	ka (1/hs)	kd (1/s)	KD (M)	KD (nM)	ka (1/hs)	kd (1/s)	KD (nM)
40G5c (E. coli)	3,58E+05	0,0256	7,15E-08	71,5	4,01E+05	0,02533	63,2
40G5c (CHO)	5,97E+05	0,03069	5,15E-08	51,5			
sp34.v52	6,08E+05	0,00535	8,78E-09	8,8			
38E4v1	4,03E+06	0,00515	1,28E-09	1,3	6,06E+06	0,005074	0,8
38E4v2	2,11E+06	0,00513	2,43E-09	2,4	2,29E+06	0,003586	1,6
38E4v3	4,98E+06	0,01599	3,21E-09	3,2	4,11E+06	0,014	3,4
38E4v4	7,21E+05	0,0984	1,37E-07	136,5	3,25E+05	0,003361	10,3
38E4v5	3,22E+06	0,05154	1,60E-08	16,0	2,05E+06	0,02246	11,0
38E4v6	2,34E+04	0,8784	3,76E-05	37600,0	51140	0,001749	34,2
38E4v7	1,14E+06	0,2897	2,54E-07	254,2	2,83E+05	0,02464	87,0
38E4v8	1,13E+04	0,04426	3,93E-06	3933,0	1,12E+06	0,2018	179,5
38E4v9	1,59E+04	1,018	6,42E-05	64200,0	72610	0,0166	228,6

Figuras 25A-25B

Activación de linfocitos T

A

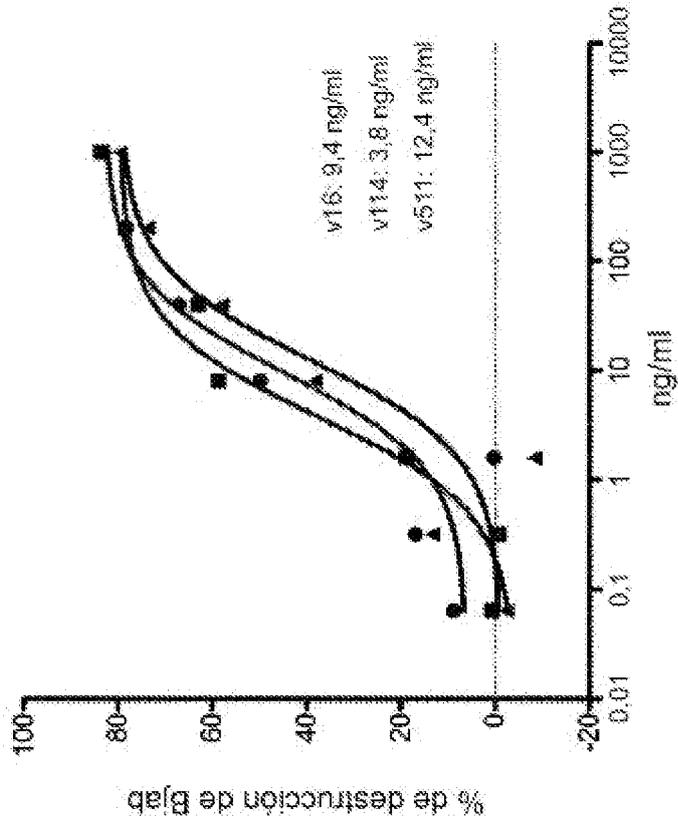
- CD20 K&H 2H7v16
- CD20 K&H 2H7v114
- ▲ CD20 K&H 2H7v511



Ensayo de destrucción de Bjab

B

- CD20 K&H 2H7v16
- CD20 K&H 2H7v114
- ▲ CD20 K&H 2H7v511



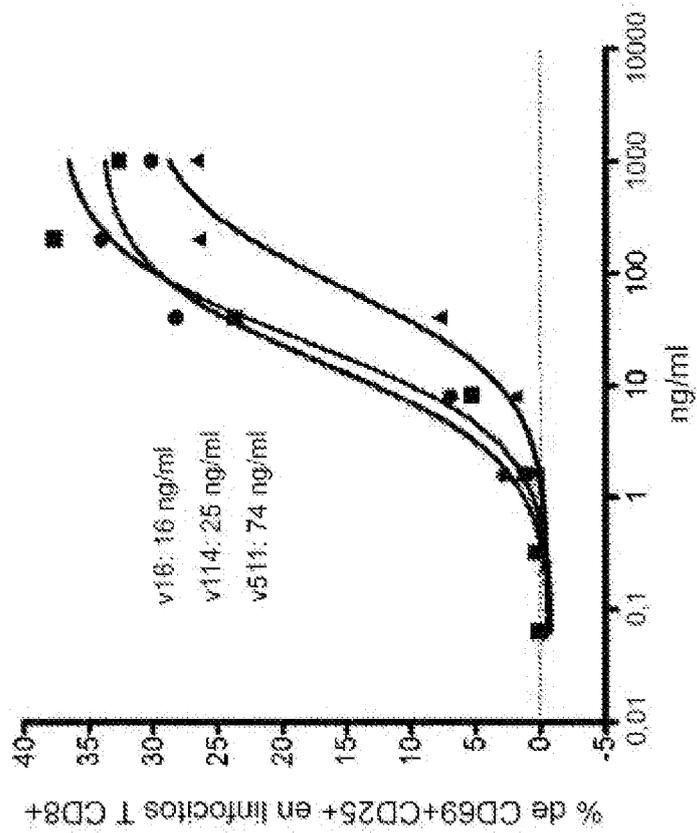
20.000 Bjab con 5x linfocitos T CD8+ hu purificados, dilución 1:5 de anticuerpo, dilución 1:5 de anticuerpo a partir de 1000 ng/ml. 24 horas.

**Figuras 26A-26B**

Activación de linfocitos T

**A**

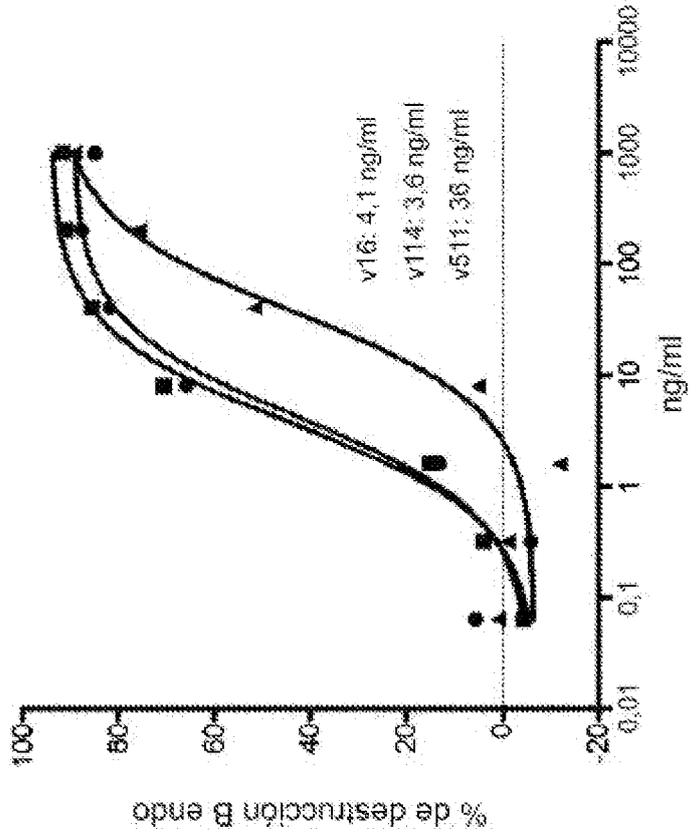
- CD20 K&H 2H7v16
- CD20 K&H 2H7v114
- ▲ CD20 K&H 2H7v511



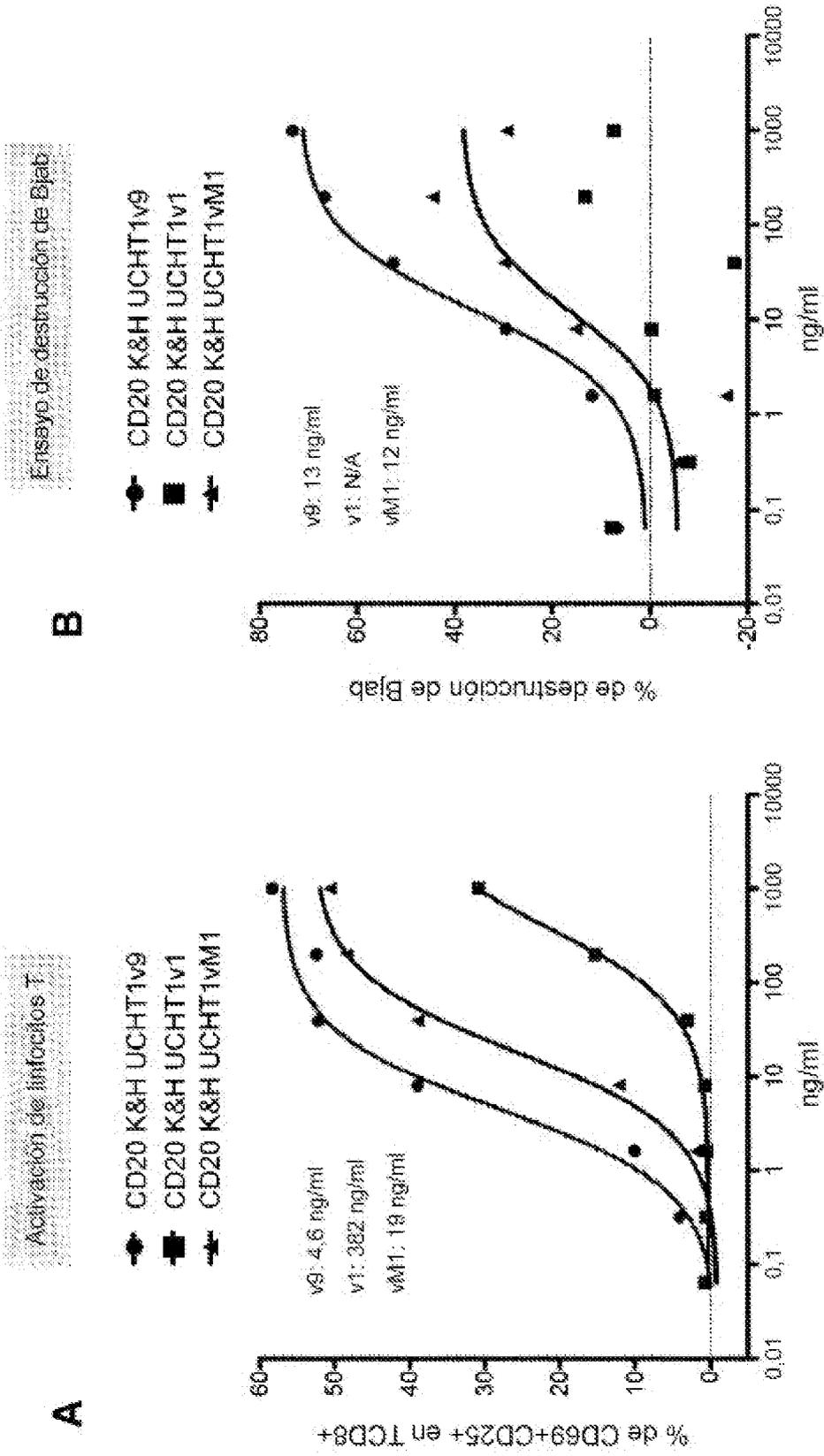
ensayo de destrucción de B endo

**B**

- CD20 K&H 2H7v16
- CD20 K&H 2H7v114
- ▲ CD20 K&H 2H7v511

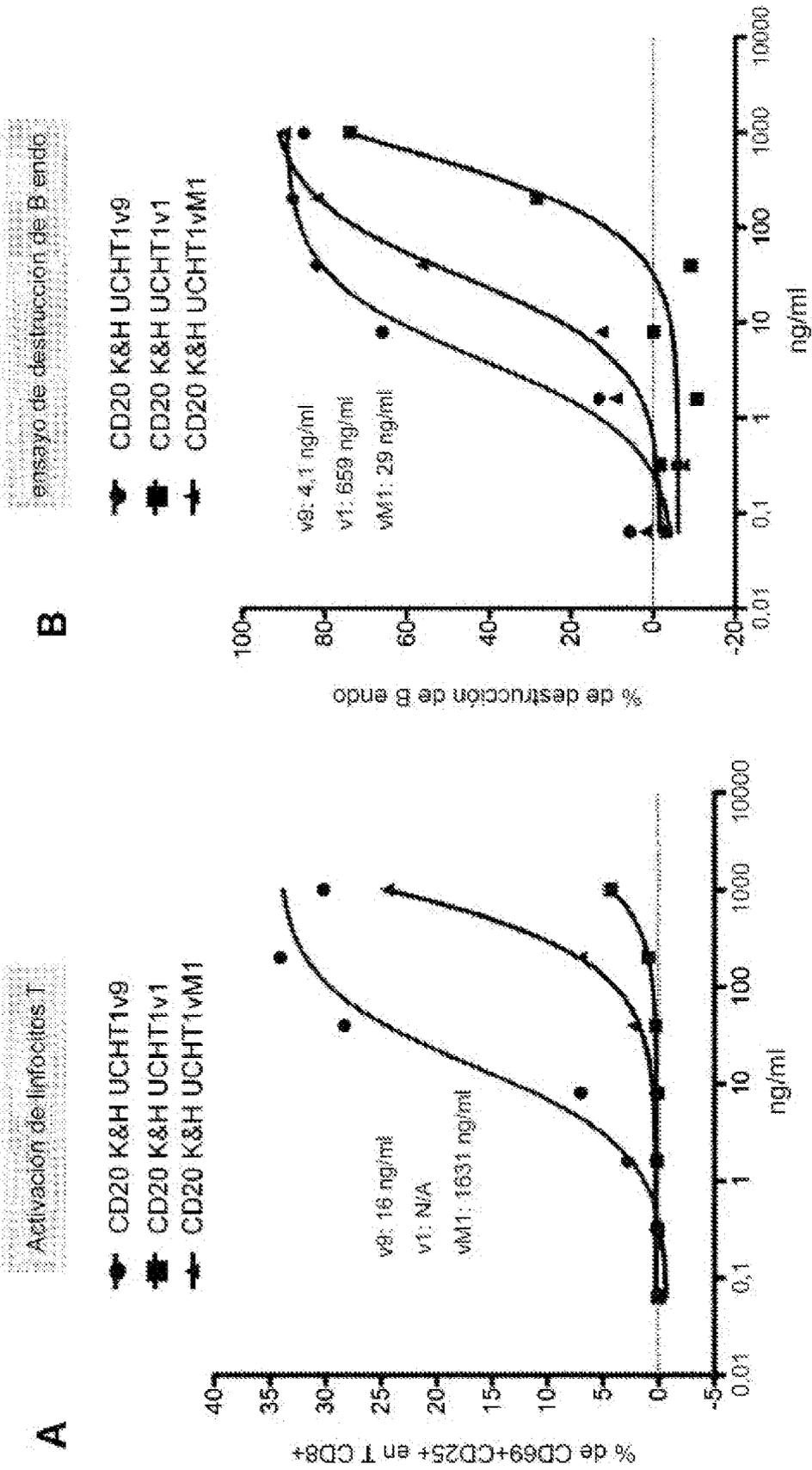


Figuras 27A-27B



20.000 Bjab con 10x PBMC humanas, dilución 1:5 de anticuerpo a partir de 1000 ng/ml, 24 horas.

**Figuras 28A-28B**



200.000 PBMC humanas solamente; dilución 1.5 de anticuerpos a partir de 1000 ng/ml, 24 horas.

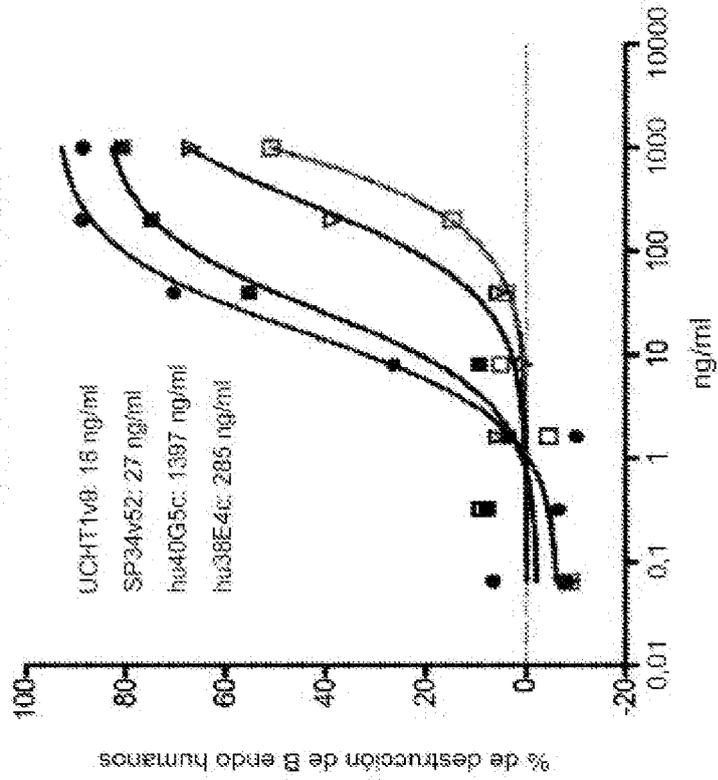
Figuras 29A-29B

Donante n.º 3

**A**

destrucción  
de B endo

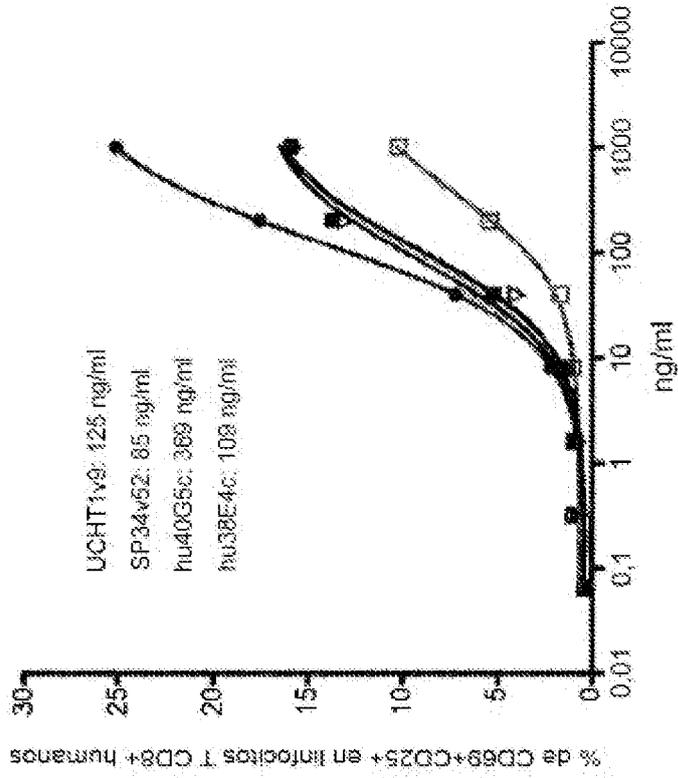
- KH CD20 2H7v16/UCHT1v9
- KH CD20 2H7v16/SP34v52
- ▣ KH CD20 2H7v16/hu40G5c
- ▤ KH CD20 2H7v16/hu38E4c



**B**

Activación de T CD8+

- KH CD20 2H7v16/UCHT1v9
- KH CD20 2H7v16/SP34v52
- ▣ KH CD20 2H7v16/hu40G5c
- ▤ KH CD20 2H7v16/hu38E4c



200.000 huP92AIC per pocillo, 24 horas. Los linfocitos B humanos se marcaron con CD19-vi50 (80).

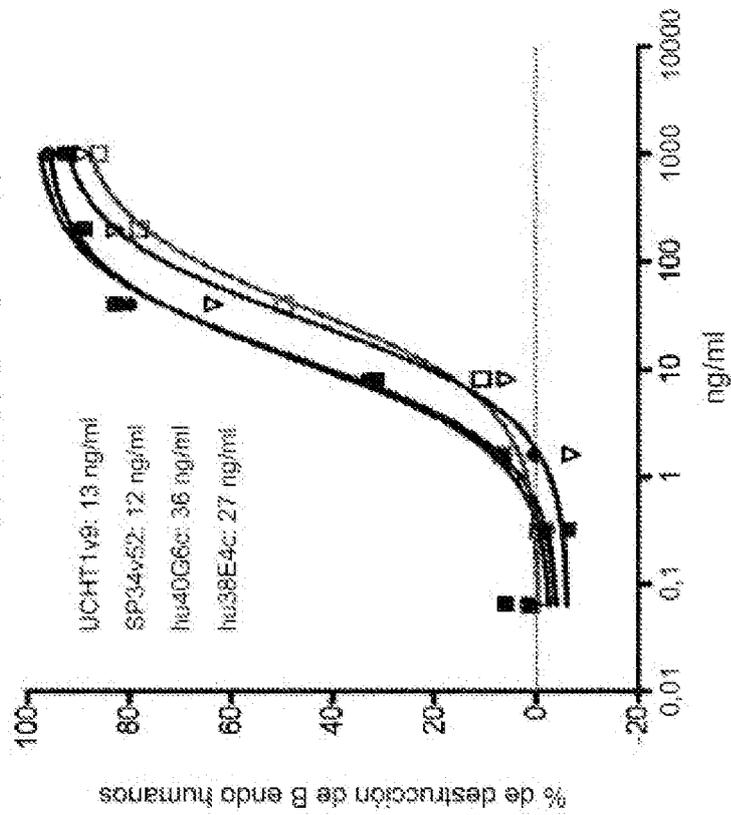
**Figuras 30A-30B**

Donante n.º 4

**A**

destrucción  
de B endo

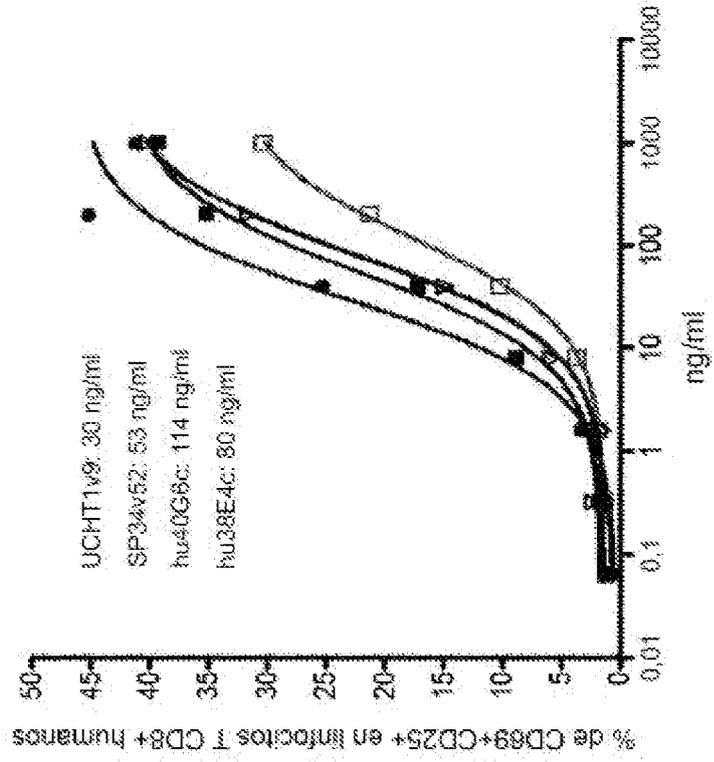
- KH CD20 2H7v16/UCHT1v9
- KH CD20 2H7v16/SP34v52
- ▨ KH CD20 2H7v16/hu40G5c
- ▲ KH CD20 2H7v16/hu38E4c



**B**

activación de T CD8+

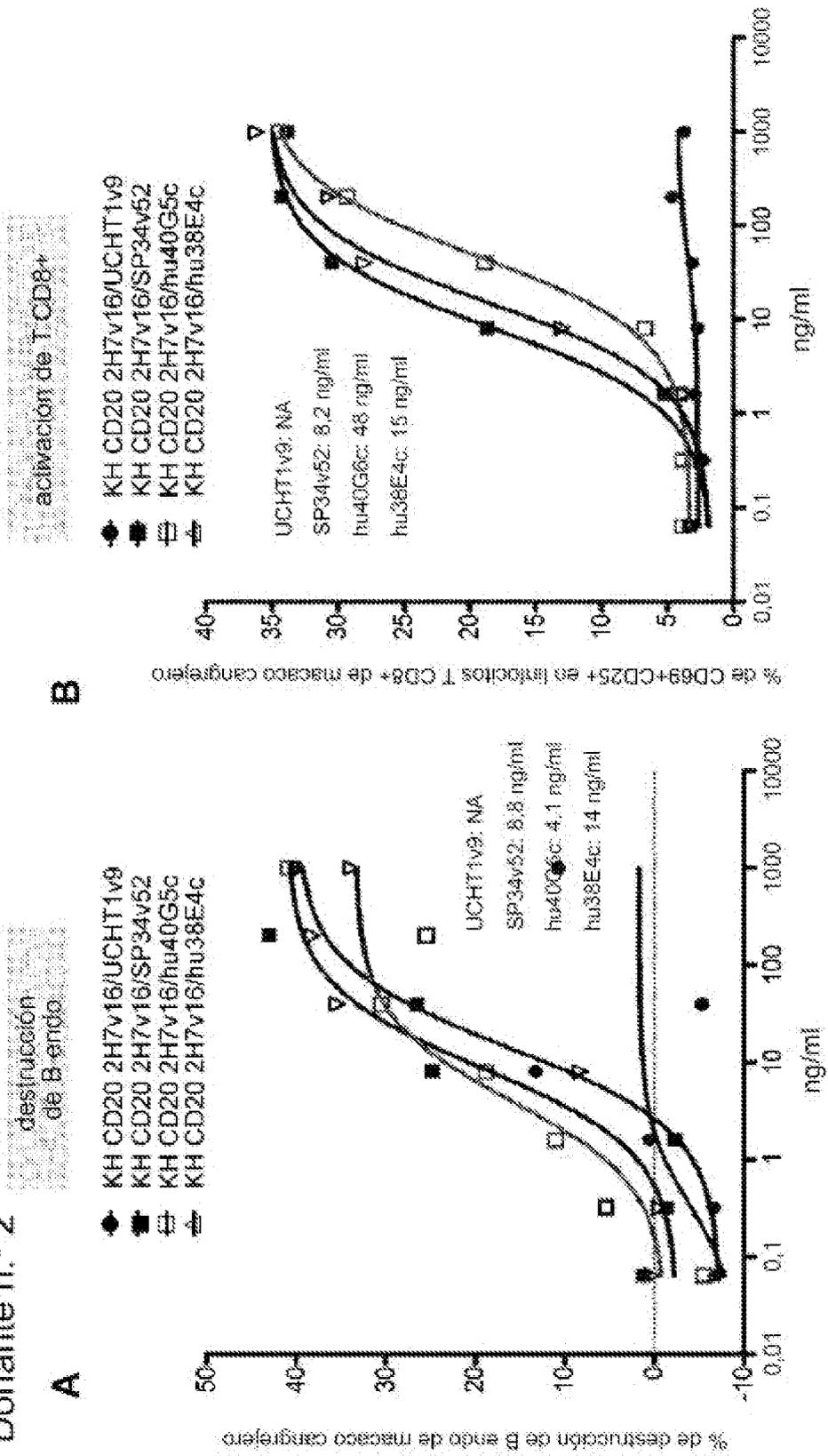
- KH CD20 2H7v16/UCHT1v9
- KH CD20 2H7v16/SP34v52
- ▨ KH CD20 2H7v16/hu40G5c
- ▲ KH CD20 2H7v16/hu38E4c



200.000 hu PBMC por pocillo, 24 horas. Los linfocitos B humanos se marcaron con CD19-v450 (BP).

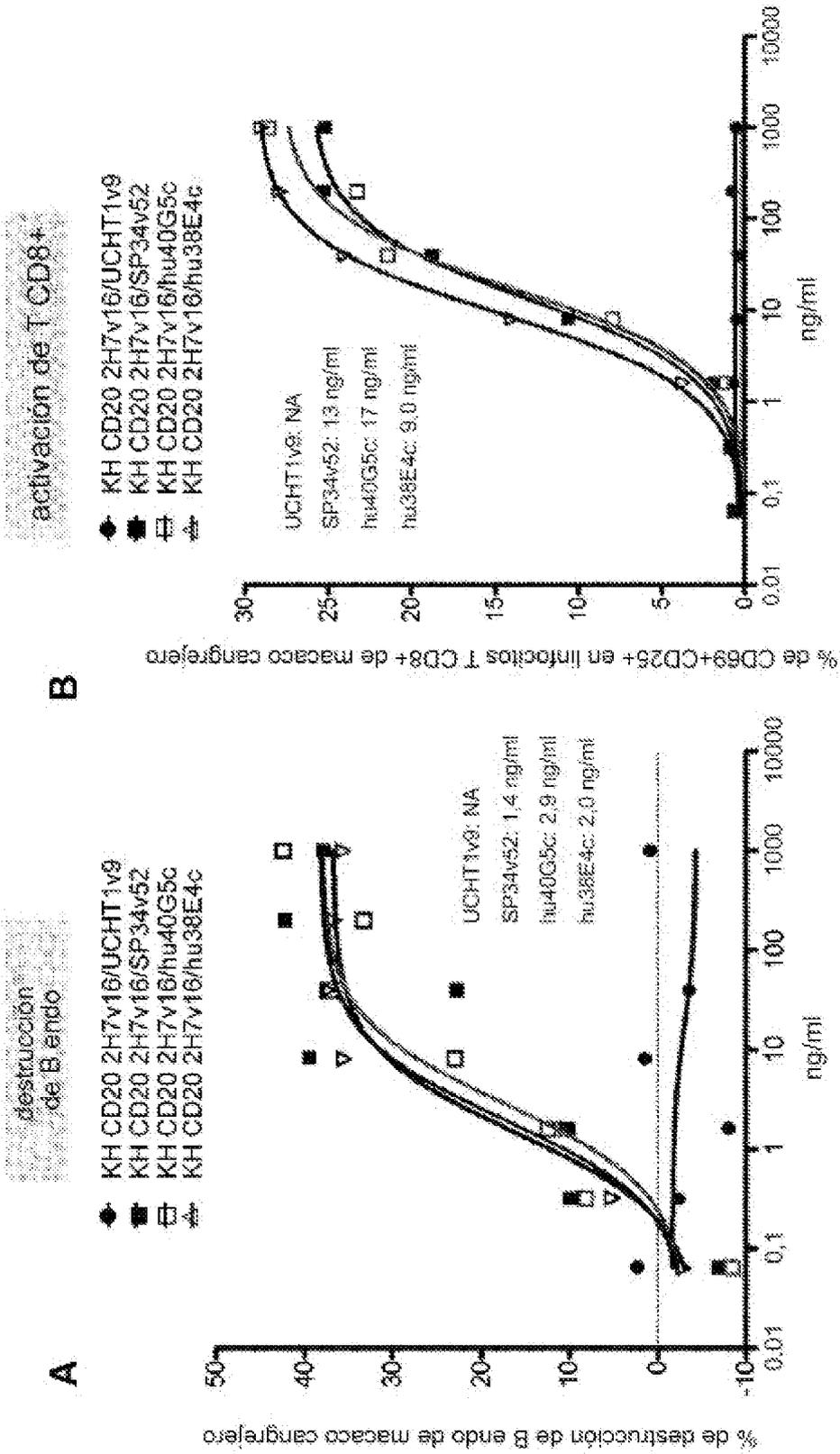
**Figuras 31A-31B**

Donante n.º 2



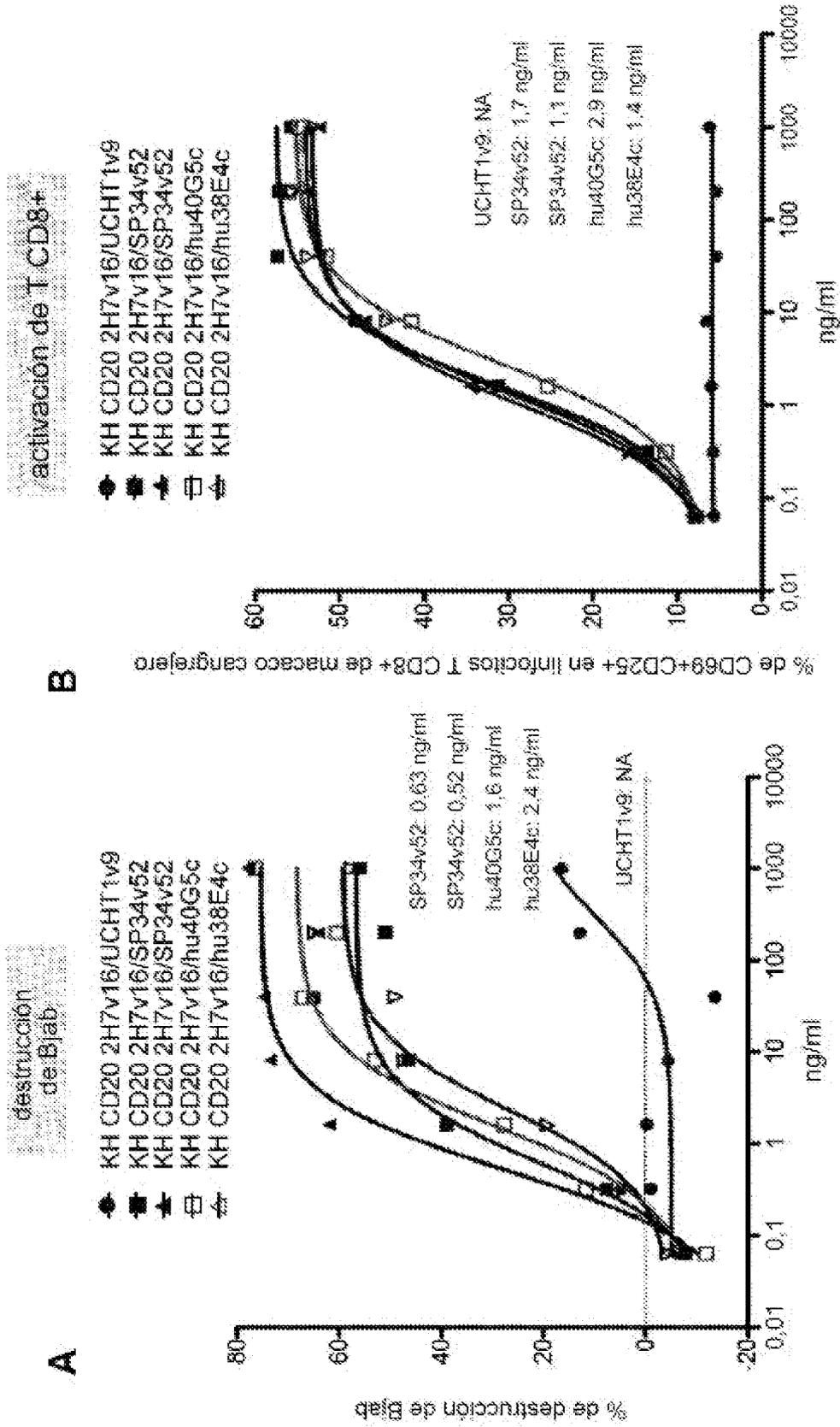
200.000 de PBMC de macaco cangrejero por pocillo. 24 horas. Los linfocitos B de macaco cangrejero se marcaron con CD79b de macaco cangrejero-PE (internamente).

Figuras 32A-32B



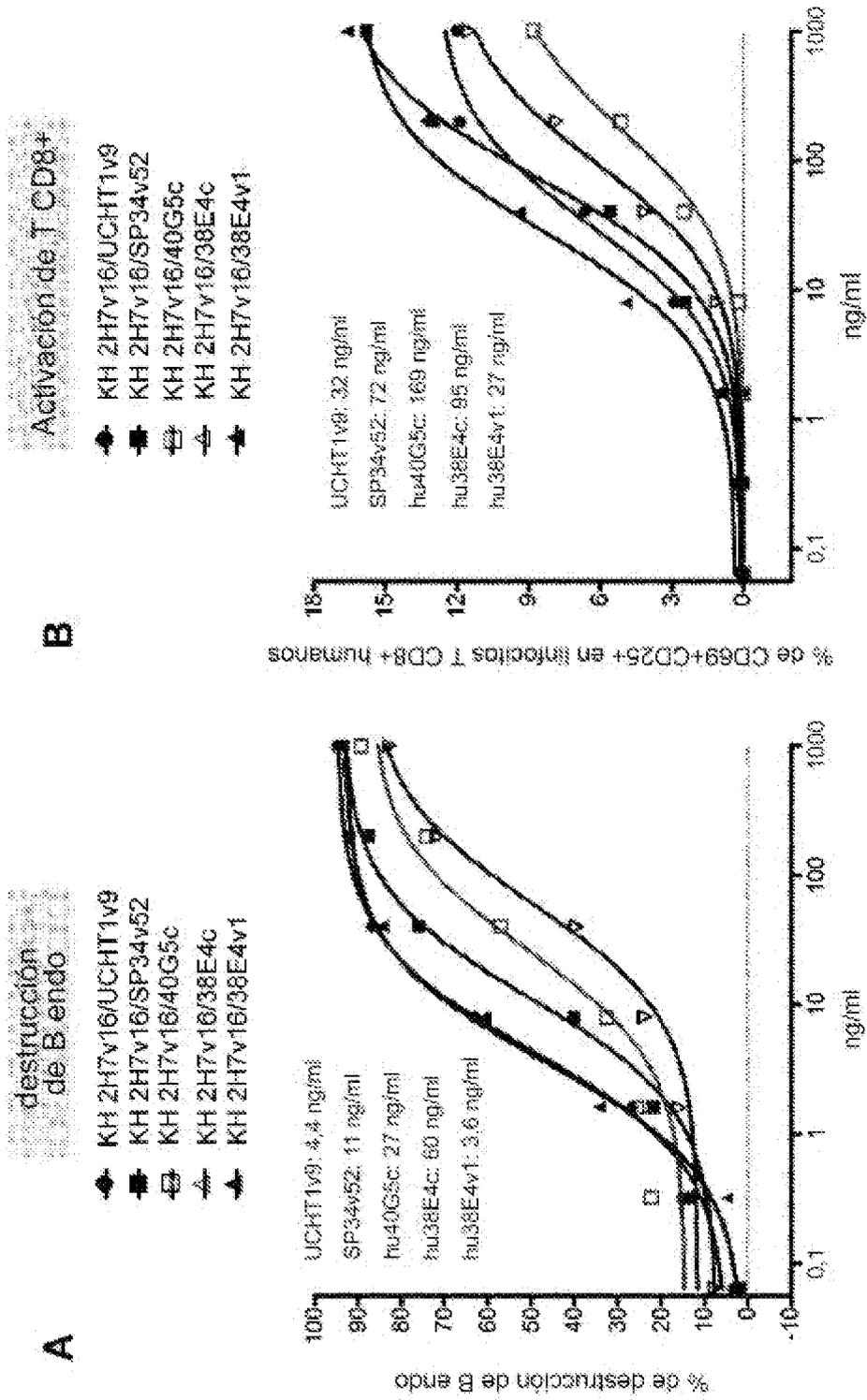
200 200 % P2M de macaco cangrejero por pocillo, 24 horas. Los linfocitos B de macaco cangrejero se marcaron con CD19b de macaco cangrejero-PE (internamente).

Figuras 33A-33B



200.000 de PBMC de macaco cangrejero por pocillo, 24 horas. Las células Bjab se marcaron con CD19-PE (BD).

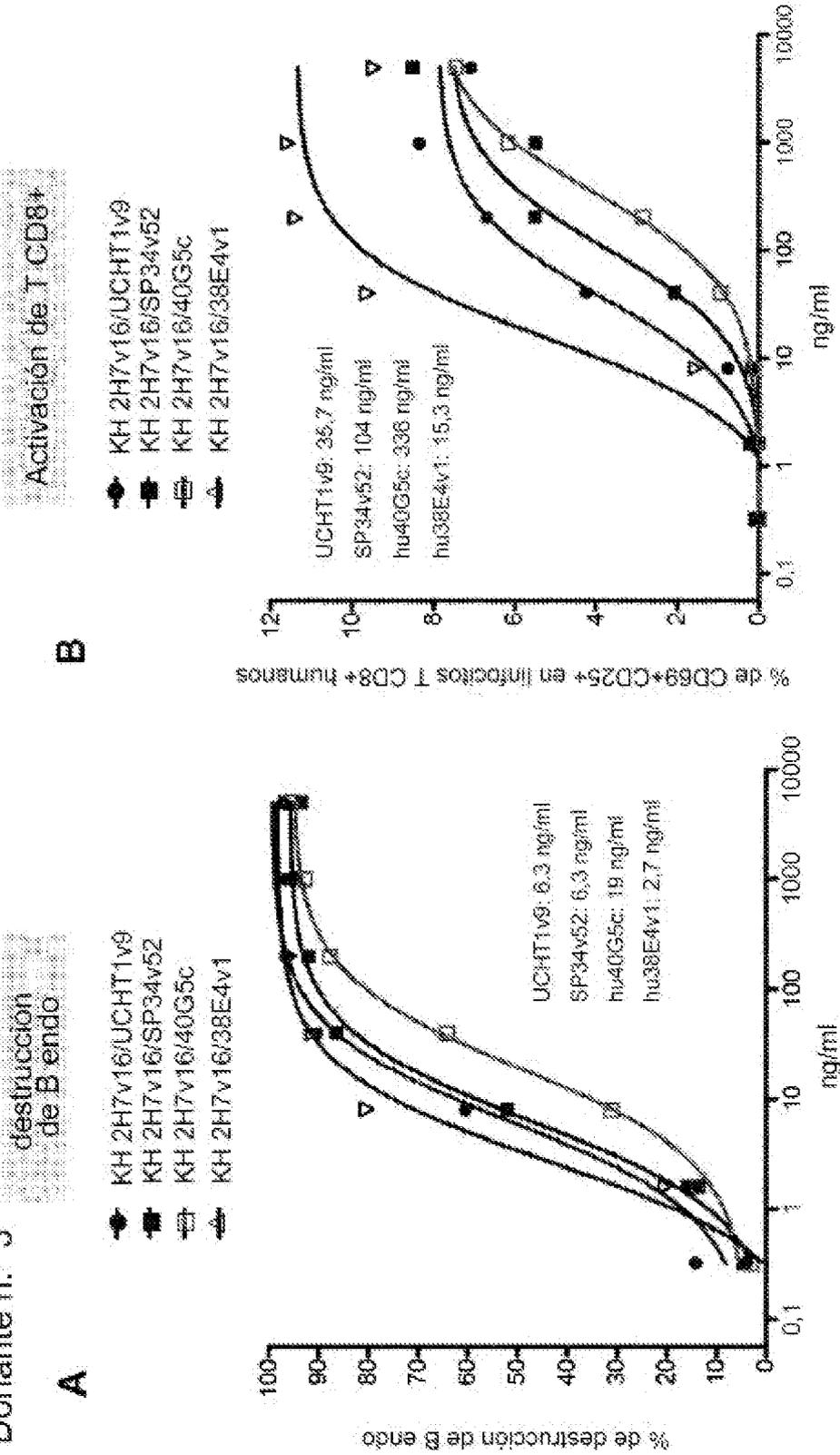
Figuras 34A-34B



200 000 hu PBMC por pocillo, 24 horas. Los linfocitos B humanos se marcaron con CD19-v450 (BD).

Figuras 35A-35B

Donante n.º 3



200.000 huPBMC por pocillo, 24 horas. Los linfocitos B humanos se marcaron con CD19-v459 (BD).

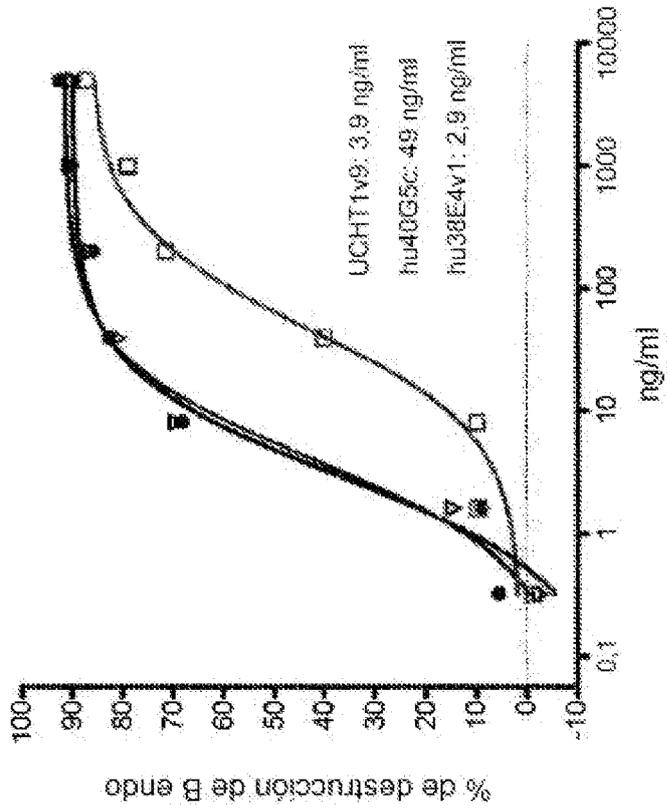
**Figuras 36A-36B**

Donante n.º 4

**A**

destrucción  
de B endo

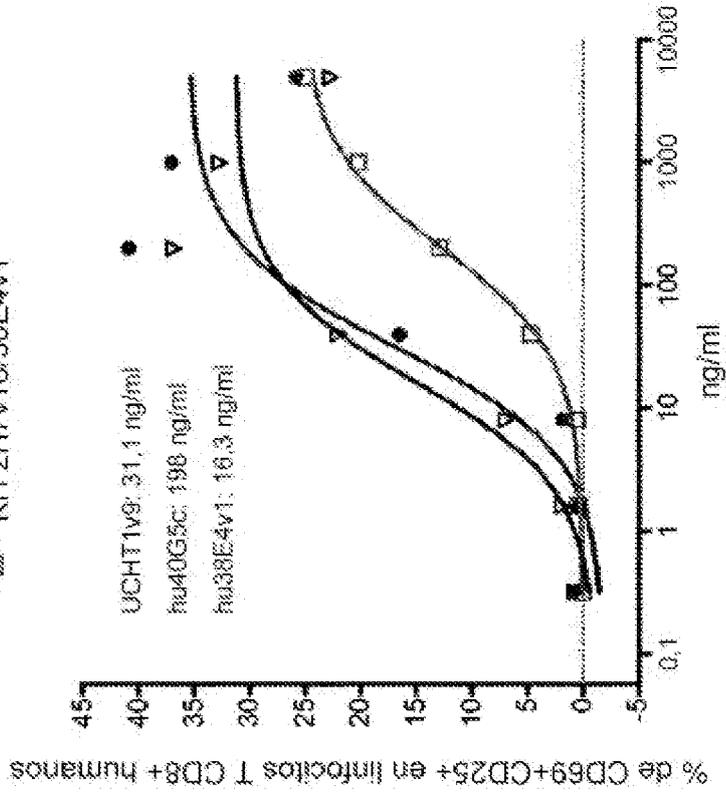
- KH 2H7v16/UCHT1v9
- KH 2H7v16/40G5c
- ▲ KH 2H7v16/38E4v1



**B**

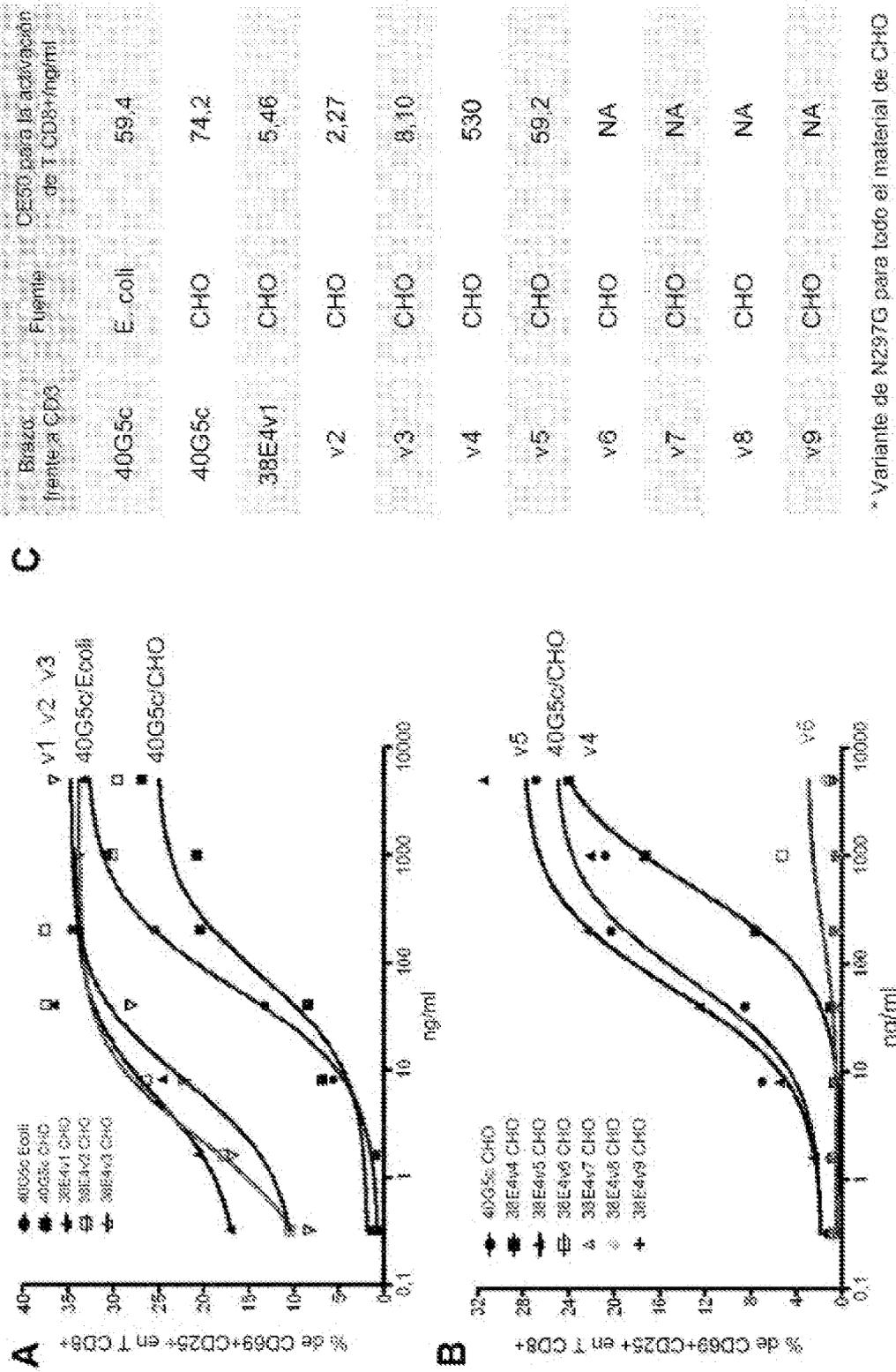
Activación de T CD8+

- KH 2H7v16/UCHT1v9
- KH 2H7v16/40G5c
- ▲ KH 2H7v16/38E4v1



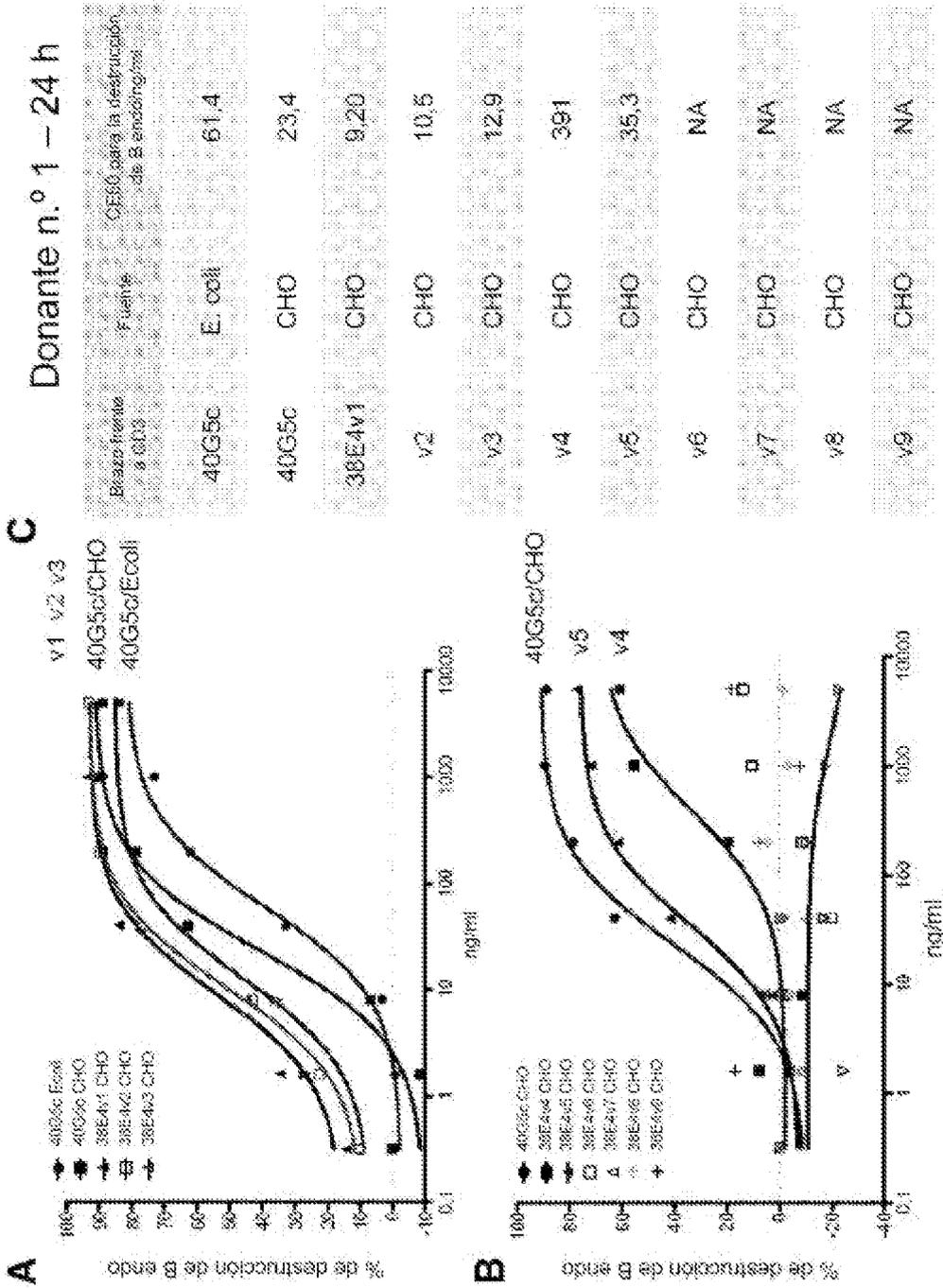
200.000 huPBMC por pocillo, 24 horas. Los linfocitos B humanos se marcaron con CD19-v450 (BD).

Figuras 37A-37C



Solo 200.000 huPBMC.

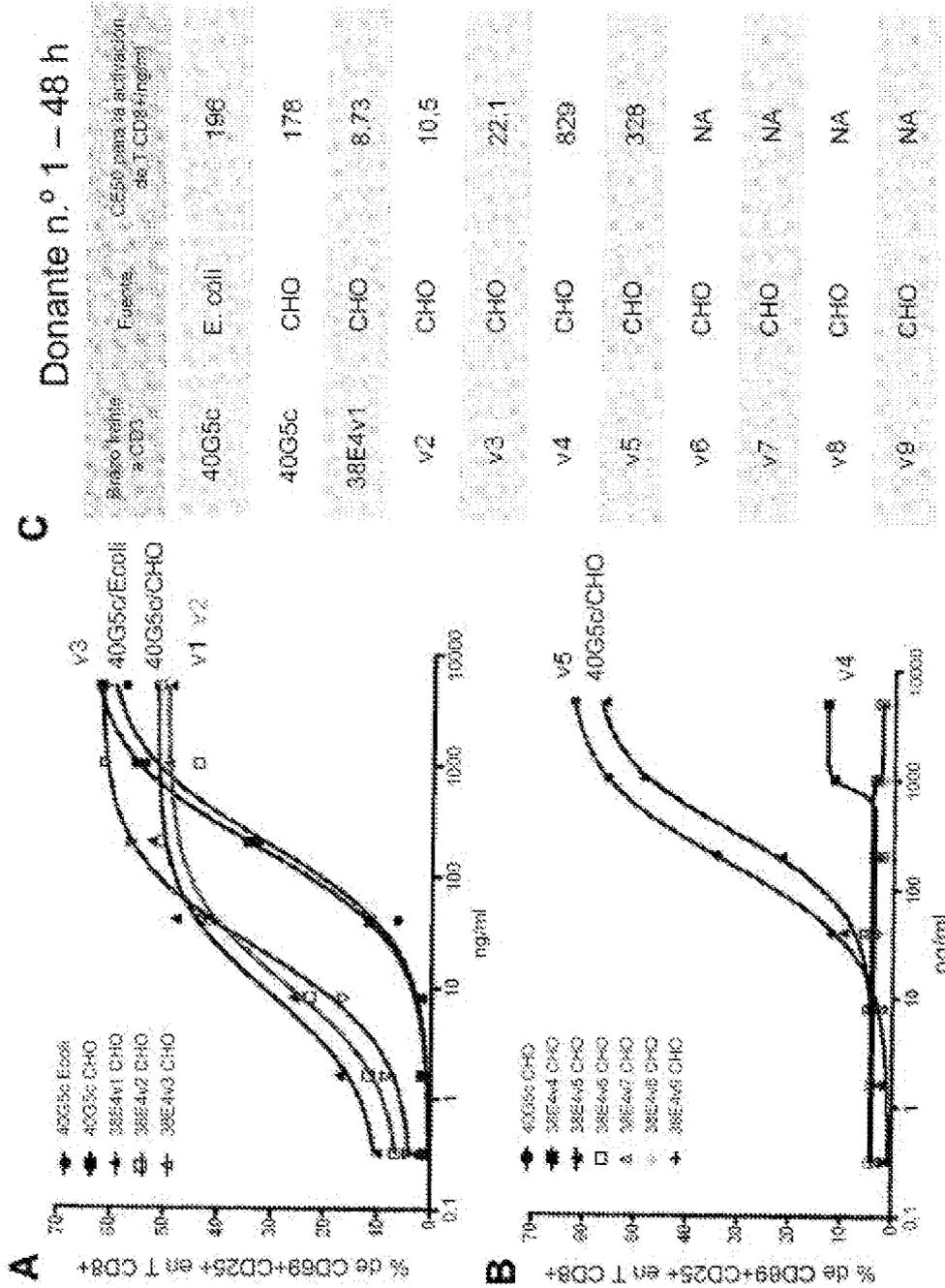
Figuras 38A-38C



\* Variante de N287G para todo el material de CHO

Scale 200,000 fuPBMC

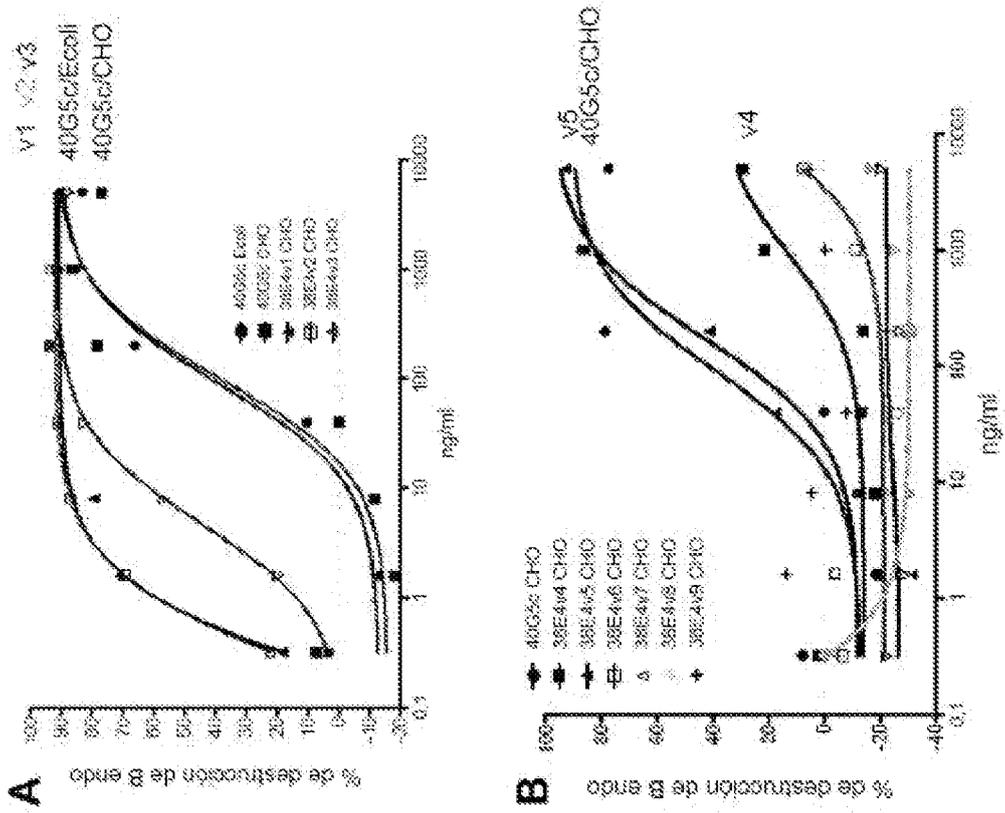
Figuras 39A-39C



\* Variante de N2B7G para todo el material de CHO

Solo 200.000 huPBMC.

Figuras 40A-40C



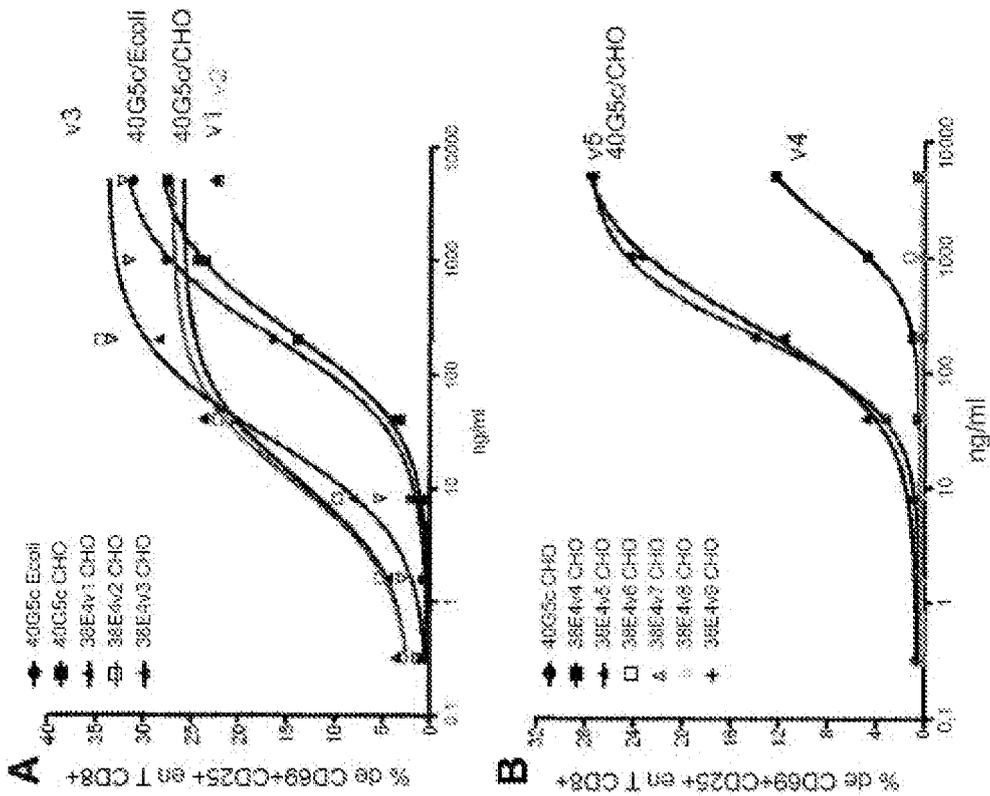
Donante n.º 1 – 48 h

Brincos/Esle a. C.125	Fuente	CE50 para la destrucción de E. endotoxigénica
40G5c	E. coli	99.5
40G5c	CHO	92.0
38E4v1	CHO	0.197
v2	CHO	0.282
v3	CHO	4.84
v4	CHO	934
v5	CHO	173
v6	CHO	NA
v7	CHO	NA
v8	CHO	NA
v9	CHO	NA

\* Variante de M287G para todo el material de CHO

Solo 200.000 huFBMC

Figuras 41A-41C



**C**

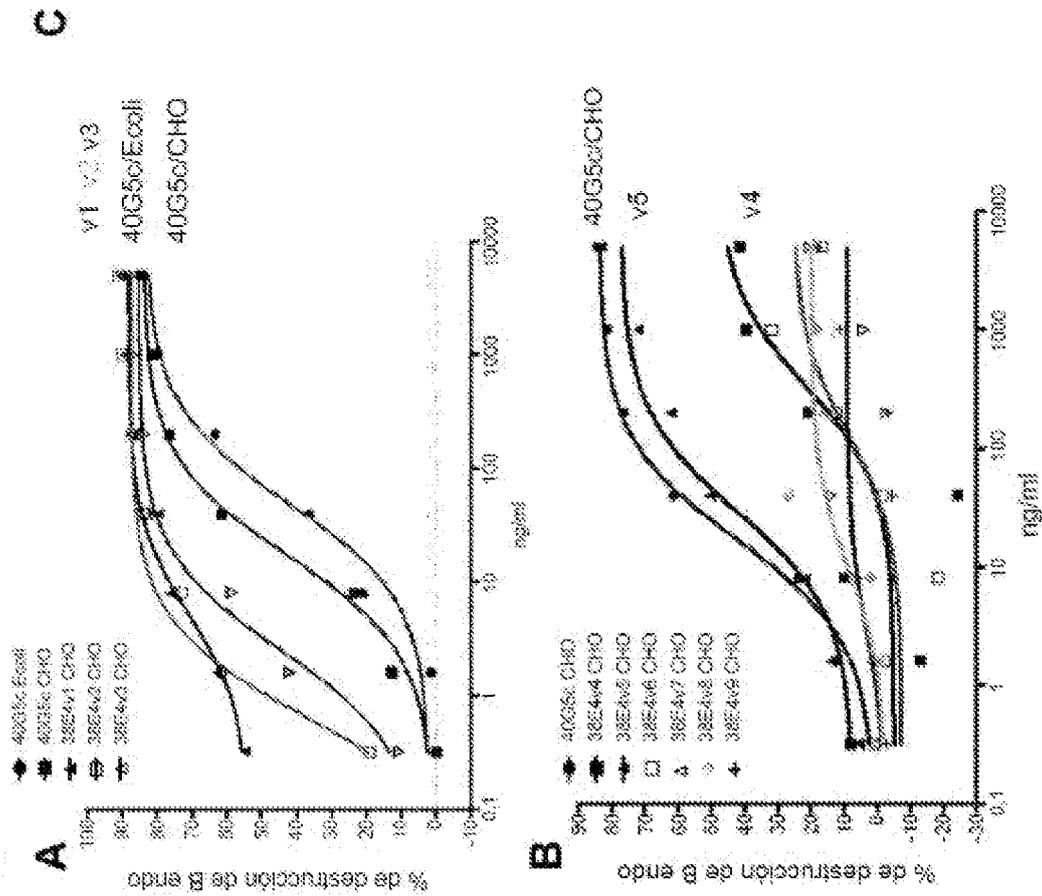
Donante n.º 2 – 24h

Grupo frente a CD3	Fuente	OE50 para la activación de T CD8+ (ng/ml)
40G5c	E. coli	215
40G5c	CHO	233
38E4v1	CHO	12,0
v2	CHO	11,4
v3	CHO	27,6
v4	CHO	9,51
v5	CHO	1,42
v6	CHO	NA
v7	CHO	NA
v8	CHO	NA
v9	CHO	NA

\* Variante de NE27G para toda el material de CHO

Solo 200.000 huPBMC.

Figuras 42A-42C



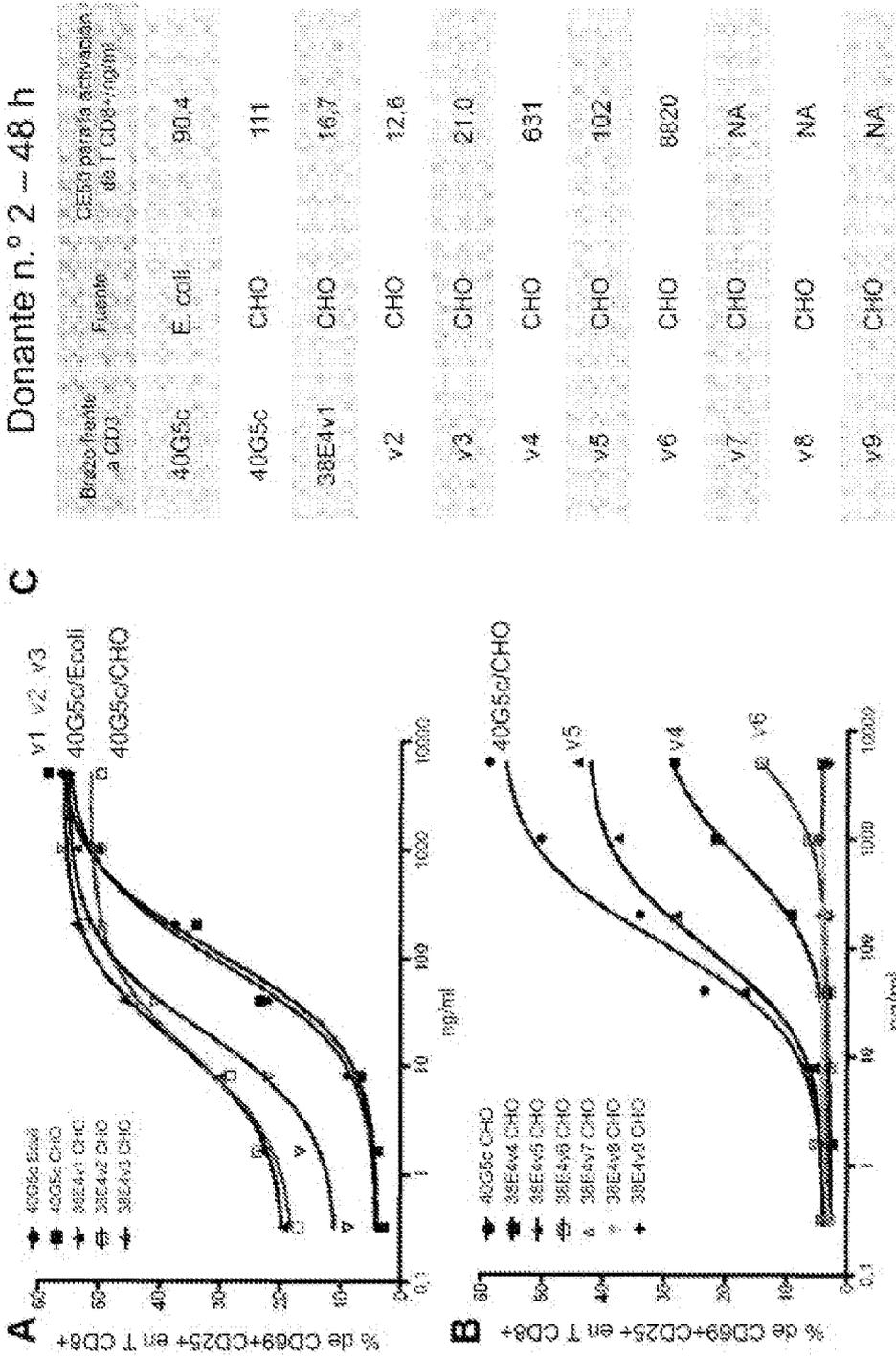
**Donante n.º 2 – 24 h**

Brazo frente a PBS	Fuente	CFU para la destrucción de B. endo (ng/ml)
40G5c	E. coli	50.3
40G5c	CHO	17,1
38E4v1	CHO	5,21
v2	CHO	0,624
v3	CHO	2,55
v4	CHO	343
v5	CHO	29,4
v6	CHO	NA
v7	CHO	NA
v8	CHO	NA
v9	CHO	NA

\* Variante de N297G para todo el material de CHO

Solo 200.000 nup/PMC.

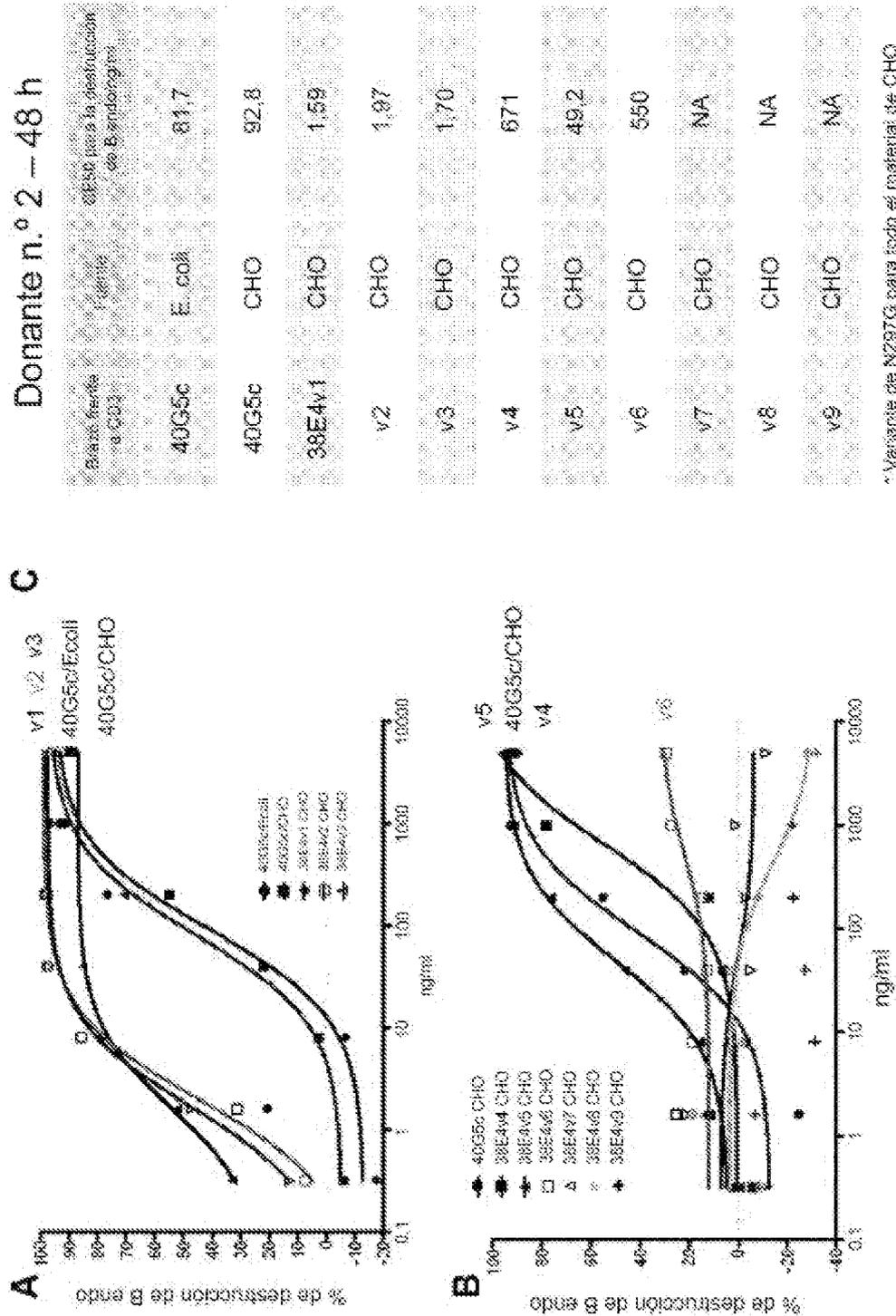
Figuras 43A-43C



\* Variante de N297G para toda el material de CHO

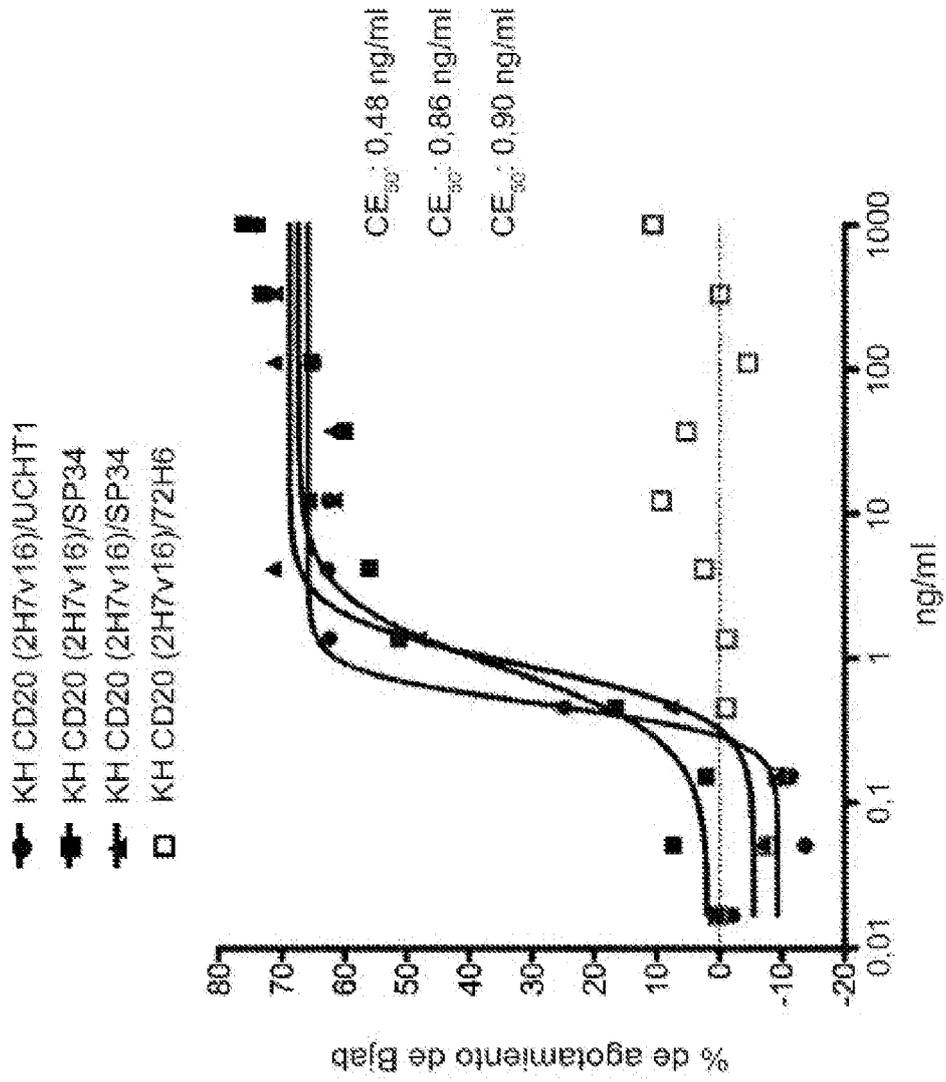
Serie 200.000 HuFBMC.

Figuras 44A-44C



Solo 200 (20) huP844C.

Figura 45A



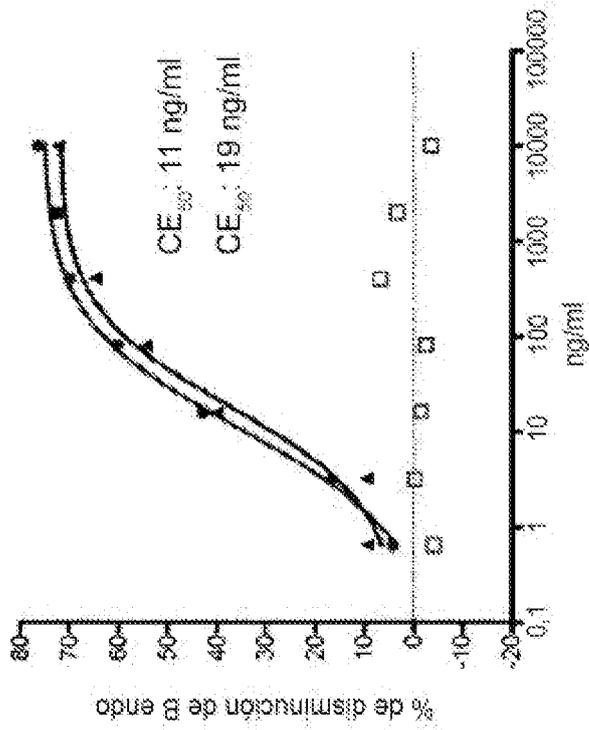
20.000 células Bjab-*luc* per pocillo con 10xhuPBM5. 24 horas.

**Figuras 45B-45C**

- KH CD20 (2H7v16)/UCHT1
- ▲ KH CD20 (2H7v16)/SP34
- KH CD20(2H7v16)/72H6

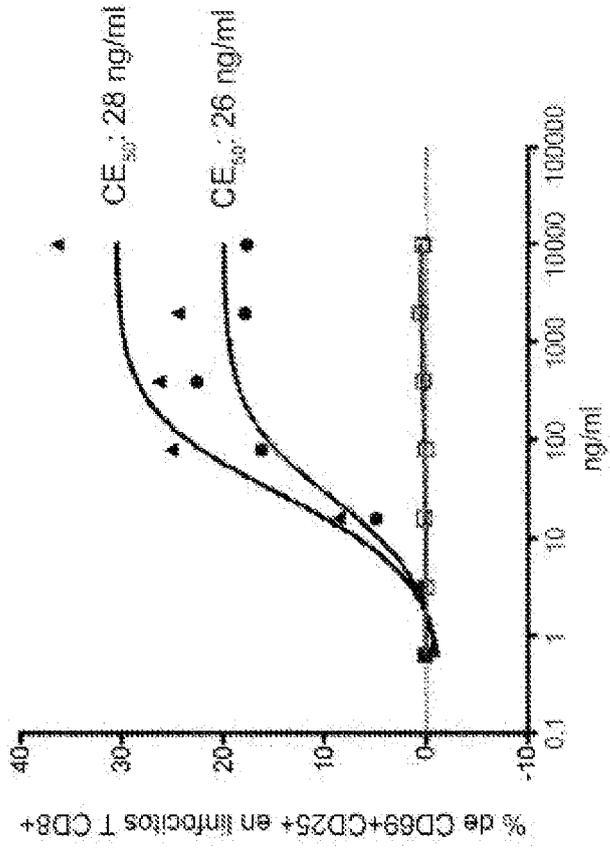
**B**

Destrucción de B periféricos



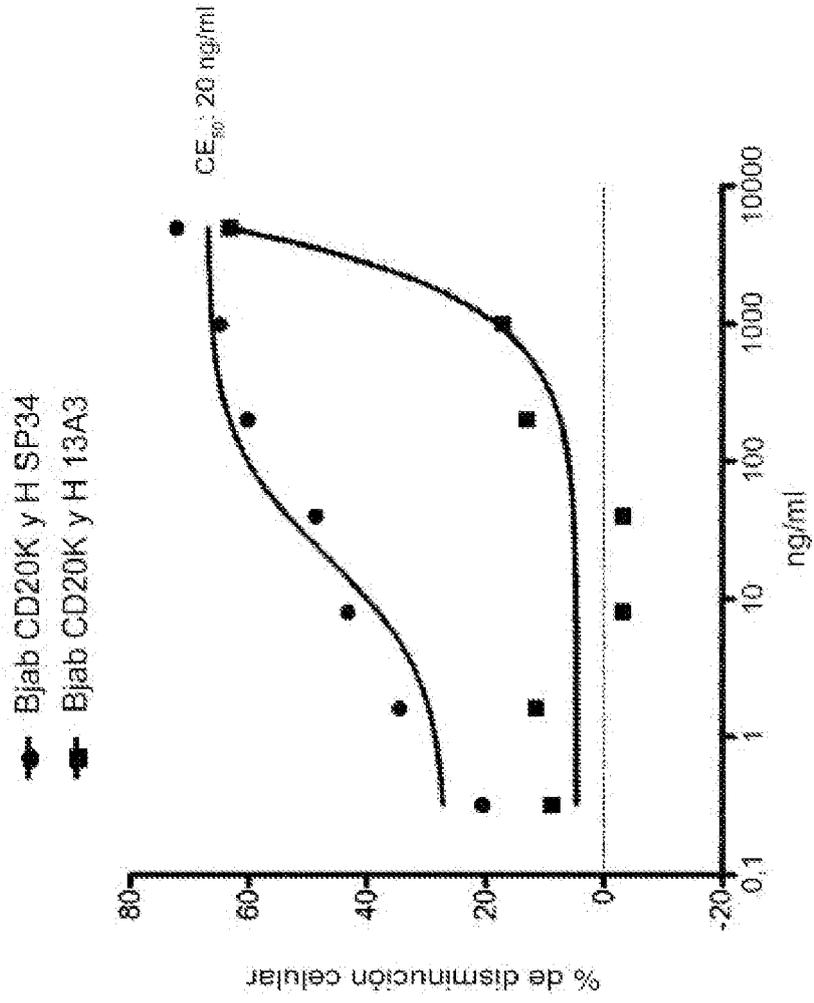
**C**

activación de T CD8+



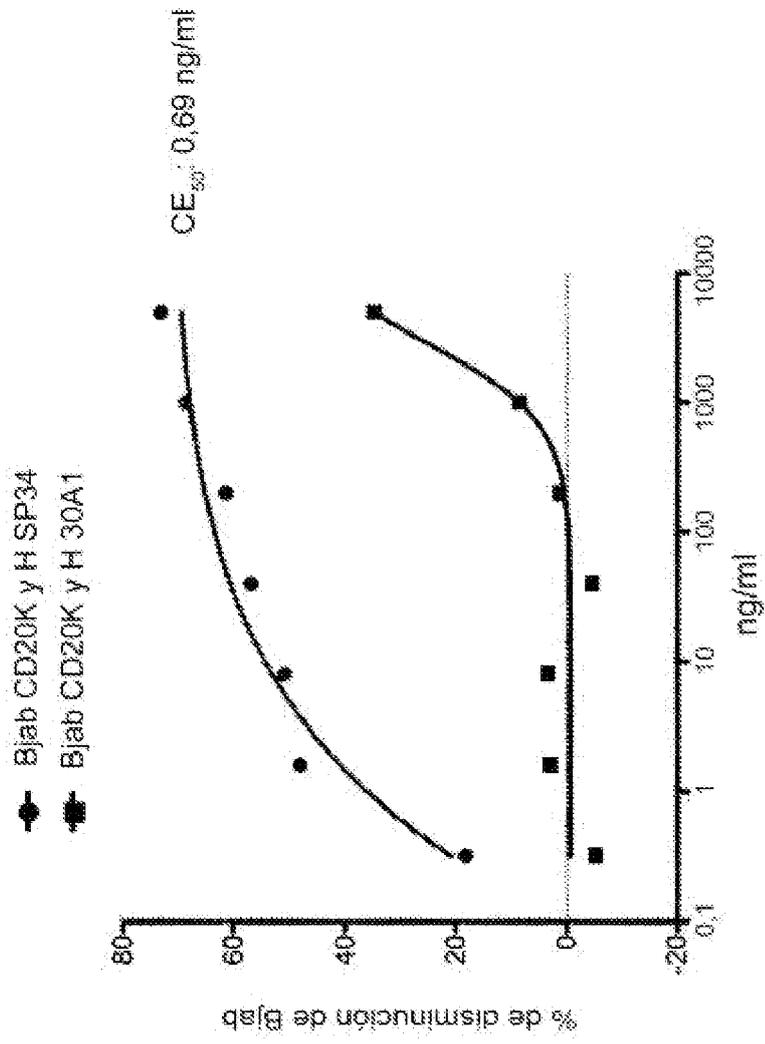
Solo 200,000 huPBMC, 24 horas.

Figura 46A



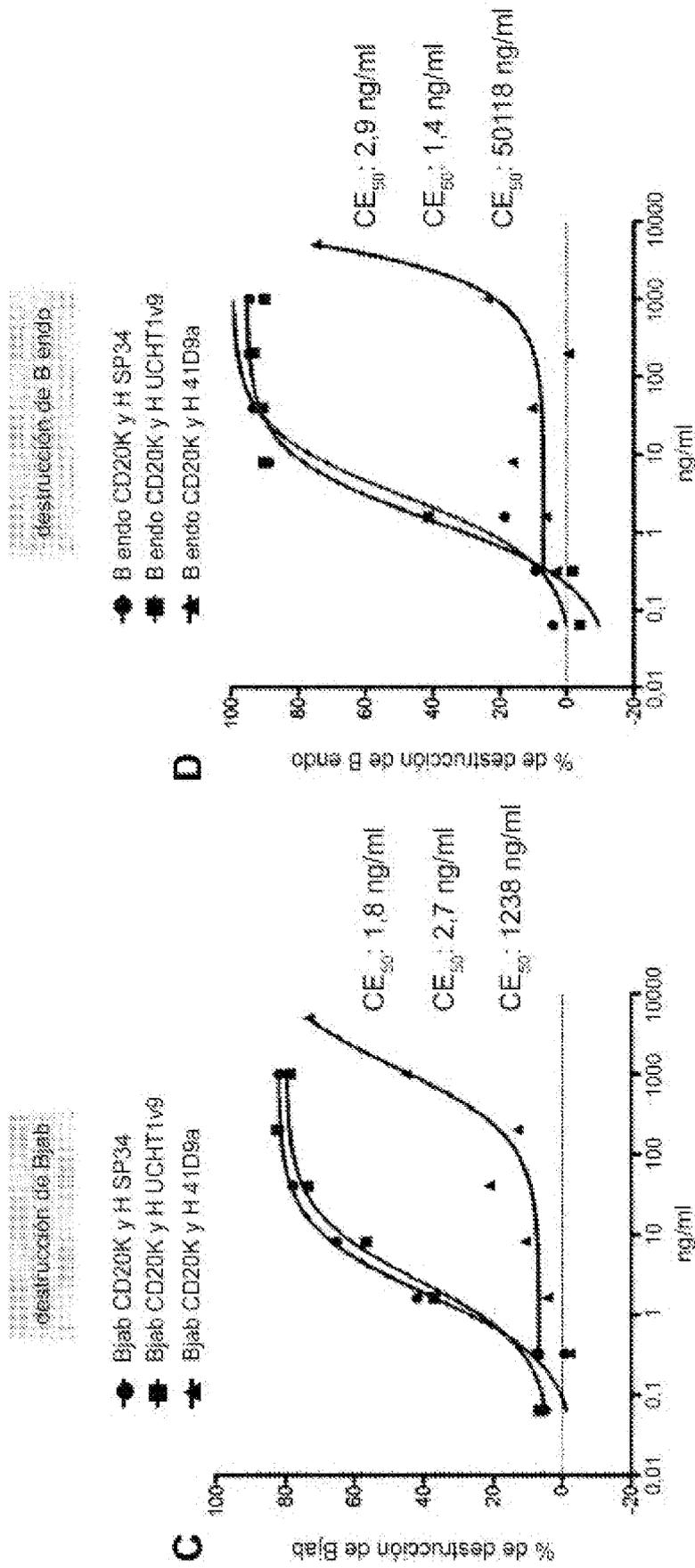
20.000 células Bjab-luc por pocillo con 10xhuPBMC, 24 horas.  
Hasta 5000 ng/ml de anticuerpo.

Figura 46B



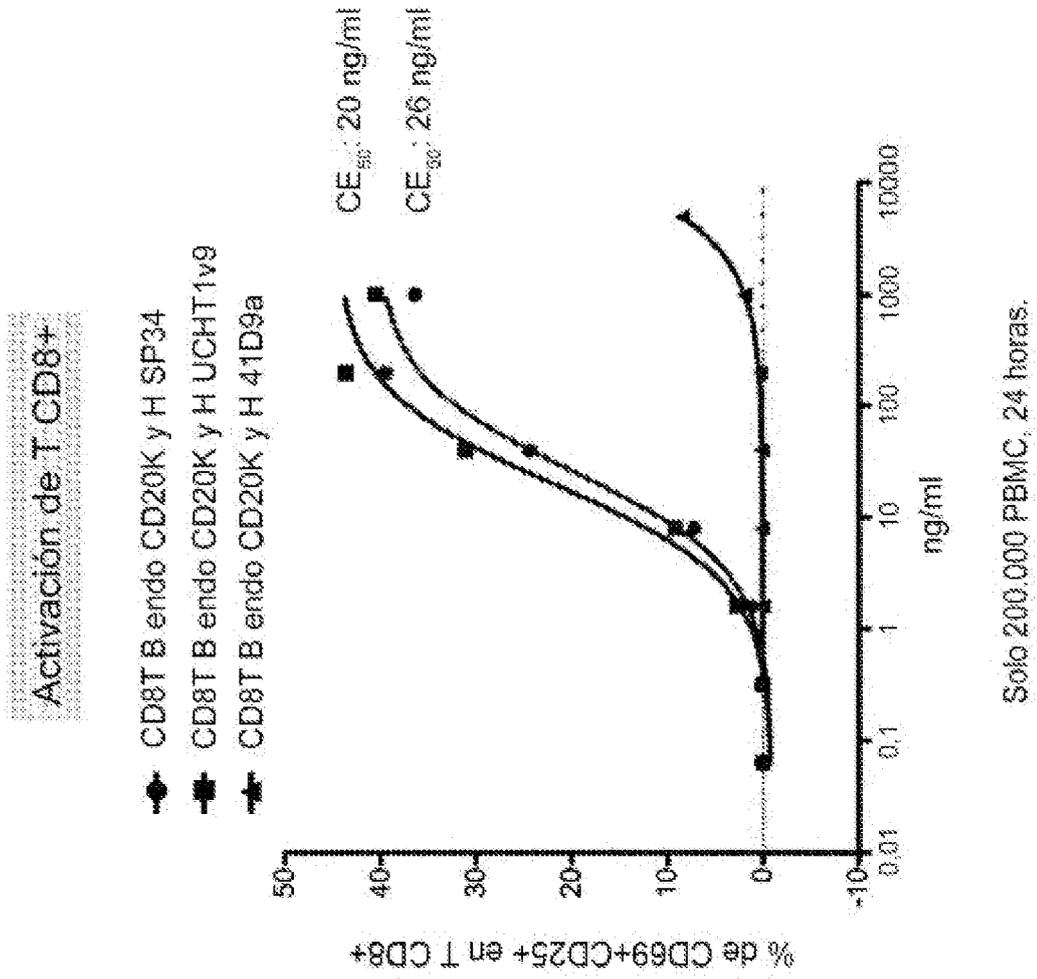
20.000 células Bjab-*luc* por pocillo con 10xhuPBMC. 24 horas.  
Hasta 5000 ng/ml de anticuerpo.

Figuras 46C-46D



20.000 células Bjab- $\mu$ c por pocillo con 10x $\mu$ PBMC, o solo PBMC, 24 horas.

Figura 46E



**Figura 47A**  
Donante n.º 1

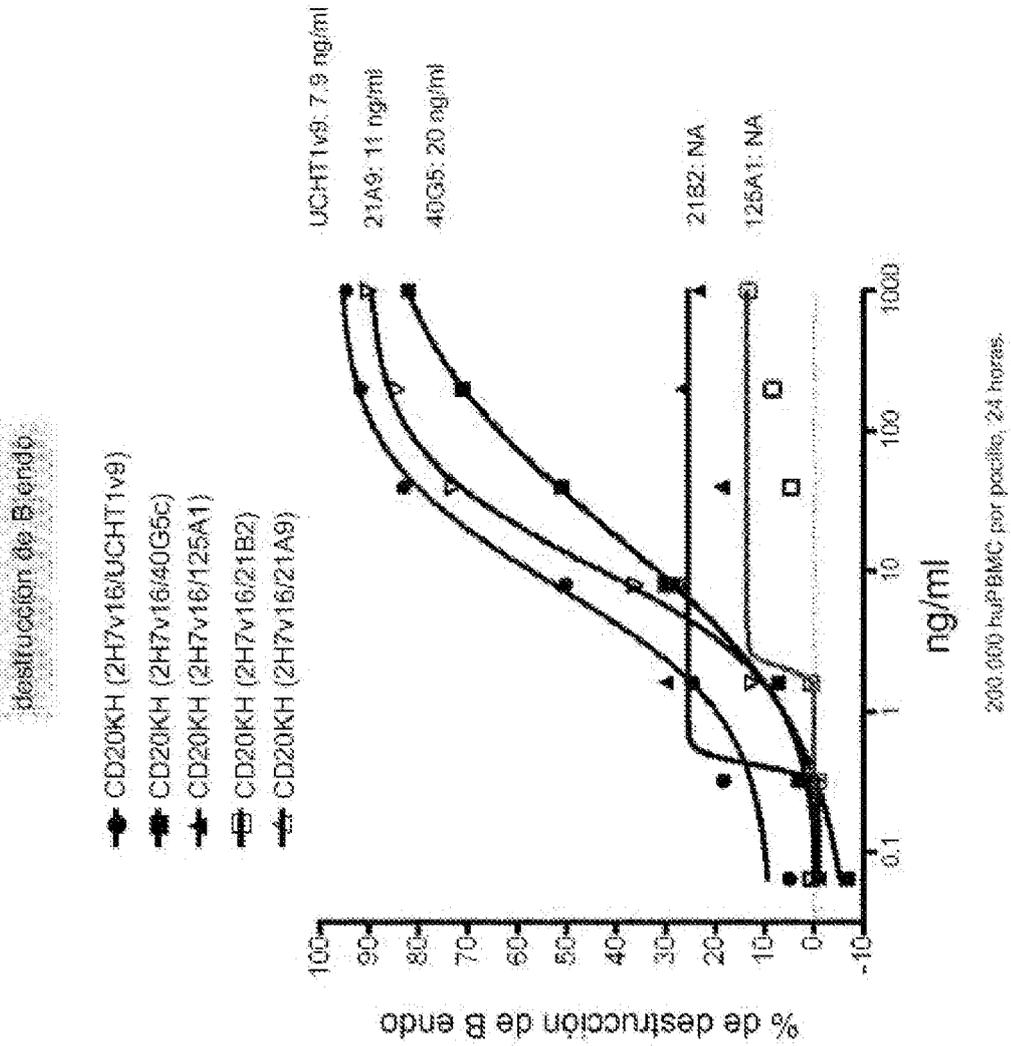
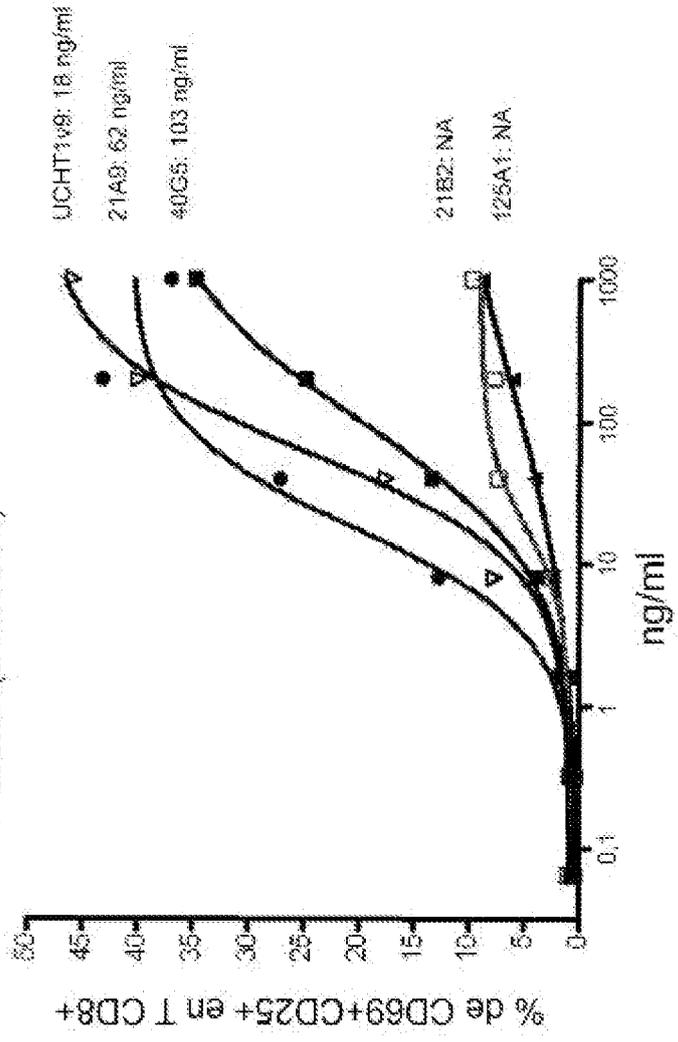


Figura 47B

Donante n.º 1

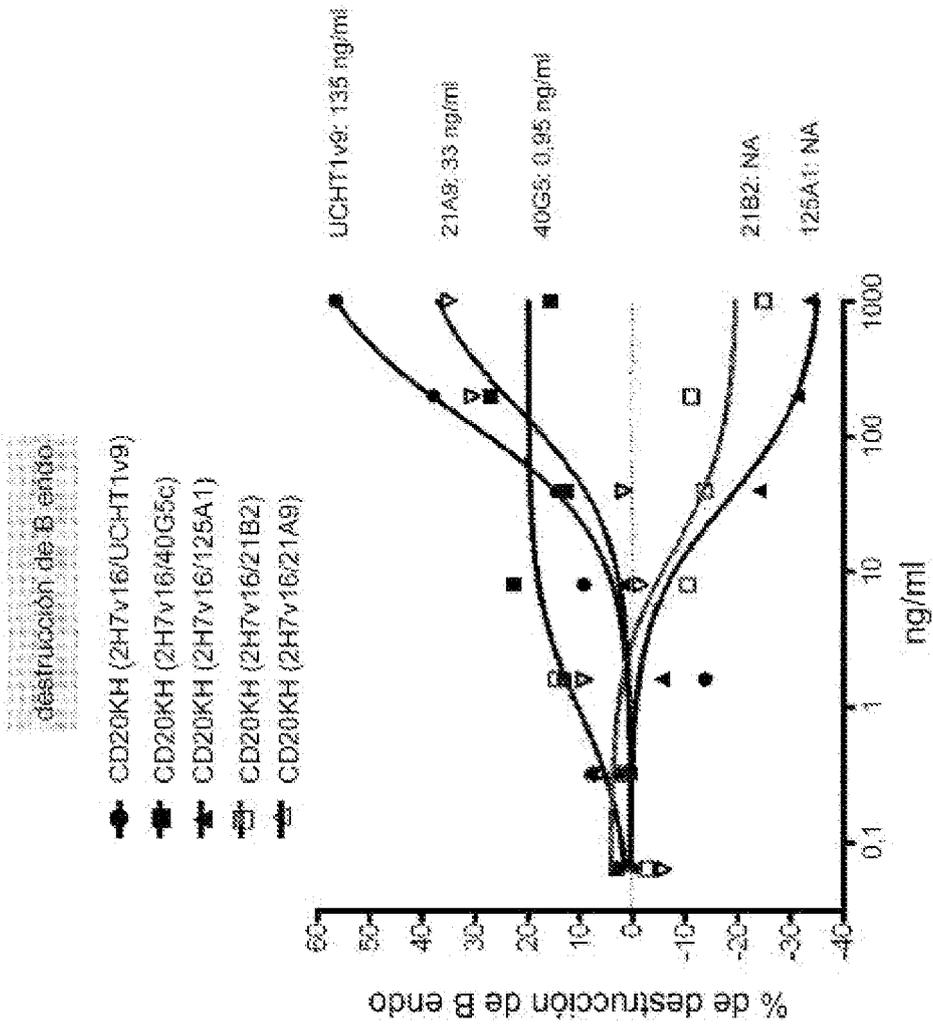
Activación de T CD8+

- CD20KH (2H7v16/UCHT1v9)
- CD20KH (2H7v16/40G5c)
- ▲ CD20KH (2H7v16/125A1)
- ▣ CD20KH (2H7v16/21B2)
- ◆ CD20KH (2H7v16/21A9)



200.000 huPBMC por pocillo, 24 horas.

**Figura 48A**  
Donante n.º 2



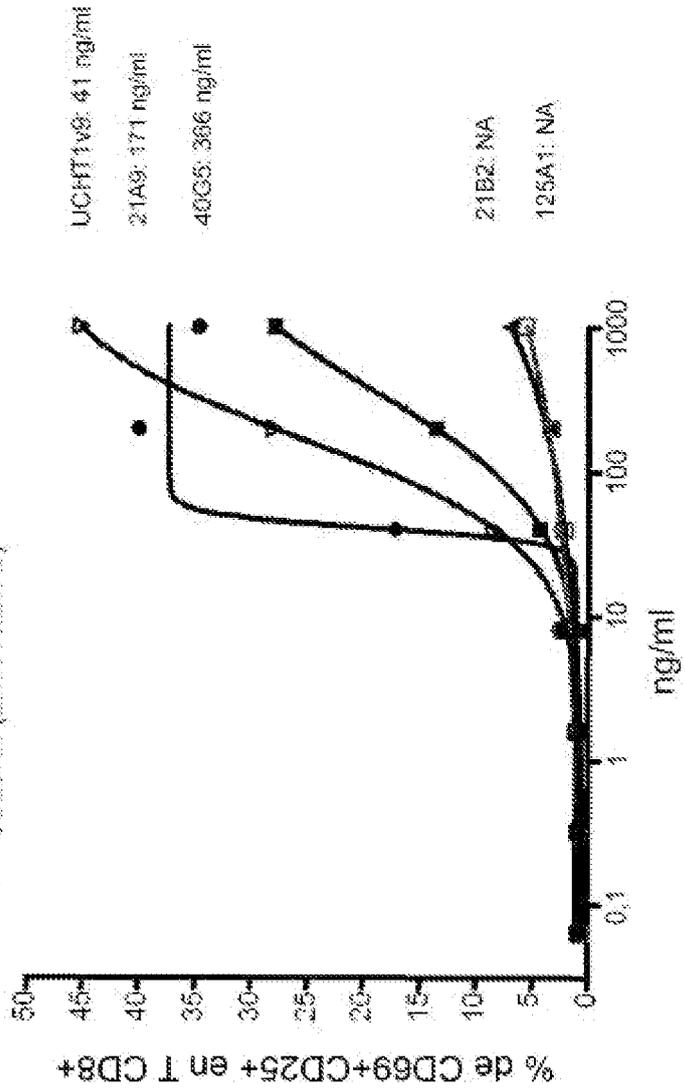
200.000 huPBMC por pocillo, 24 horas.

**Figura 48B**

Donante n.º 2

**Activación de T CD8+**

- CD20KH (2H7v16/UCHT1v9)
- CD20KH (2H7v16/40G5c)
- ▲ CD20KH (2H7v16/125A1)
- ▣ CD20KH (2H7v16/21B2)
- ▤ CD20KH (2H7v16/21A9)



200.000 huPEM3 per poço, 24 horas.

Figura 49

Estado de la FICHA	Brasero de la FICHA	Forma de la FICHA	Material de la FICHA
2H7V16	UCHT1V9	K y H	alta
2H7V16	72H6	K y H	no
2H7V16	13A3	K y H	baja
2H7V16	30A1	K y H	baja
2H7V16	41D9a	K y H	baja
2H7V16	SP34V52	K y H	alta
2H7V16	40G5c	K y H	alta
2H7V16	38E4c, 38E4V1-V9	K y H	alta
2H7V16	21B2	K y H	muy baja
2H7V16	125A1	K y H	muy baja
2H7V16	21A9	K y H	alta

Figura 50

Cadena ligera, kappa: Anticuerpo humanizado alineado con K1H3

Número de Kabat:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27	28 29 30 31 32 33 34 35 36
K1H3	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q	G I S S Y L A W Y
2H7 v16 botón	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q	S E V S Y A W Y

Número de Kabat:	37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54	55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71
K1H3	Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L	Q S G V P S R F S G S G S G T D F
2H7 v16 botón	Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L	S G V P S R F S G S G S G T D F

Número de Kabat:	72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95	96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
K1H3	T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y S Y P	F T F G Q G T K V E I K
2H7 v16 botón	T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W S F N P	F T F G Q G T K V E I K

Cadena pesada: Anticuerpo humanizado alineado con K1H3

Número de Kabat:	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	36 37 38 39 40 41 42 43 44
K1H3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S	W V R Q A P G K G
2H7 v16 botón	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T S Y N M S	W V R Q A P G K G

Número de Kabat:	45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84
K1H3	L E W V G A I S S S G S S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A
2H7 v16 botón	L E W V G A I Y F G A S S T S Y N Q K K G R F T I S V D S K N T L Y L Q M N S L R A

Número de Kabat:	85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113	
K1H3	E D T A V Y Y C A R V V Y Y S N S Y W Y	F D Y W S G G T L V T V S S
2H7 v16 botón	E D T A V Y Y C A R V V Y Y S N S Y W Y	F D W S G G T L V T V S S

# Figura 51

Cadena ligera, kappa: Anticuerpo humanizado alineado con K4H1

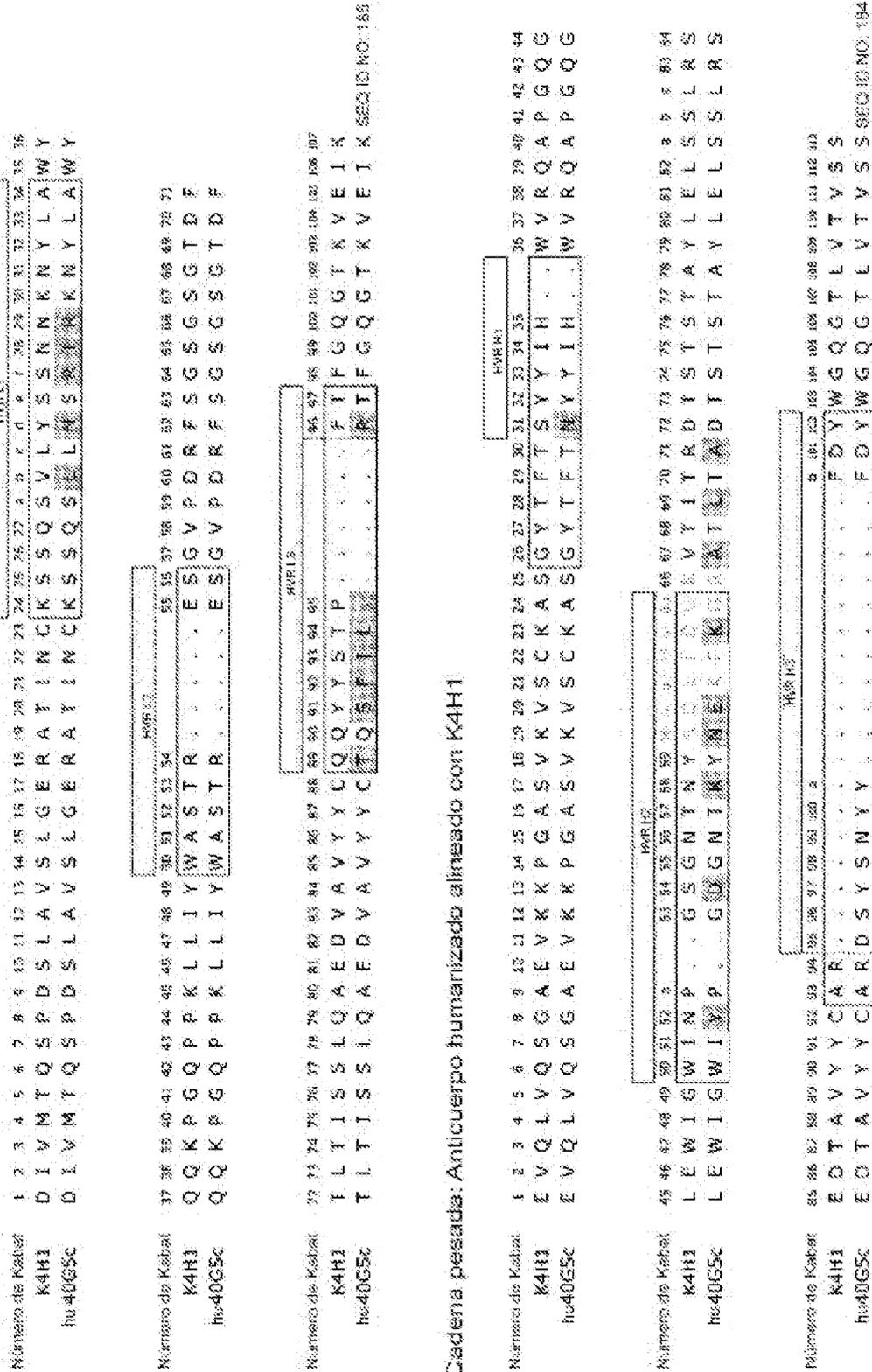


Figura 52A Análisis CC para TDB frente a CD20

Análisis por SEC: Sin agregación detectable

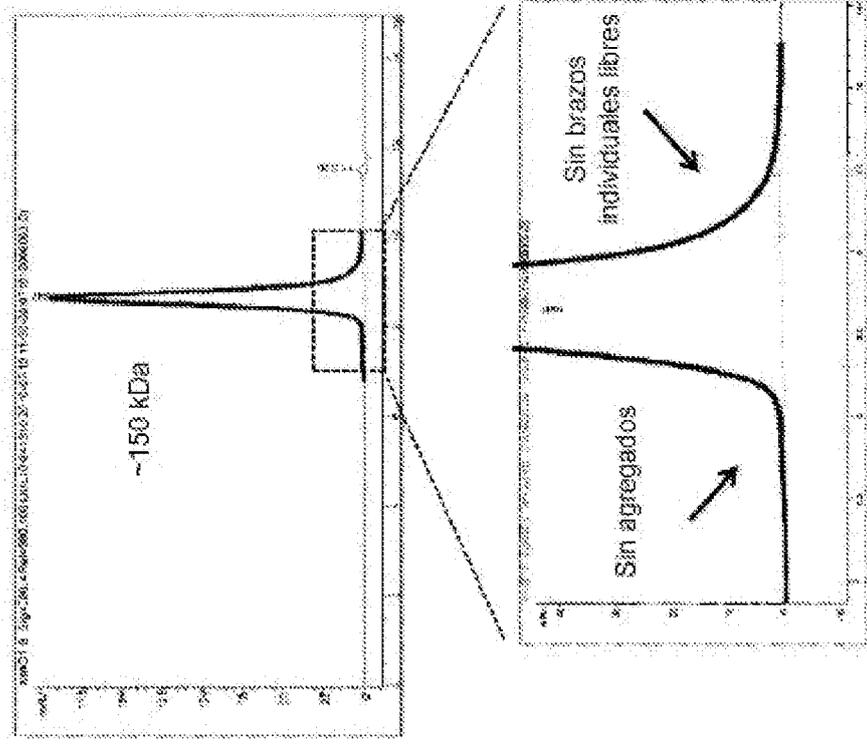
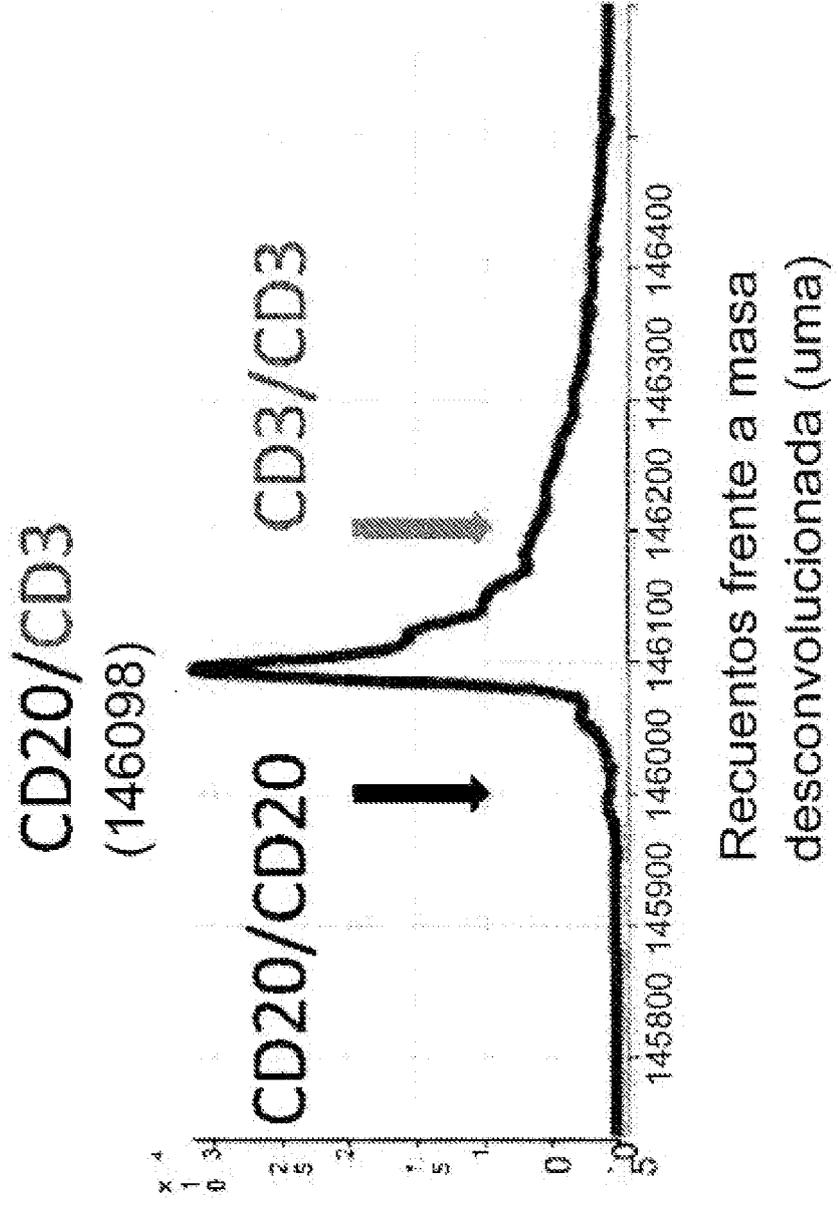


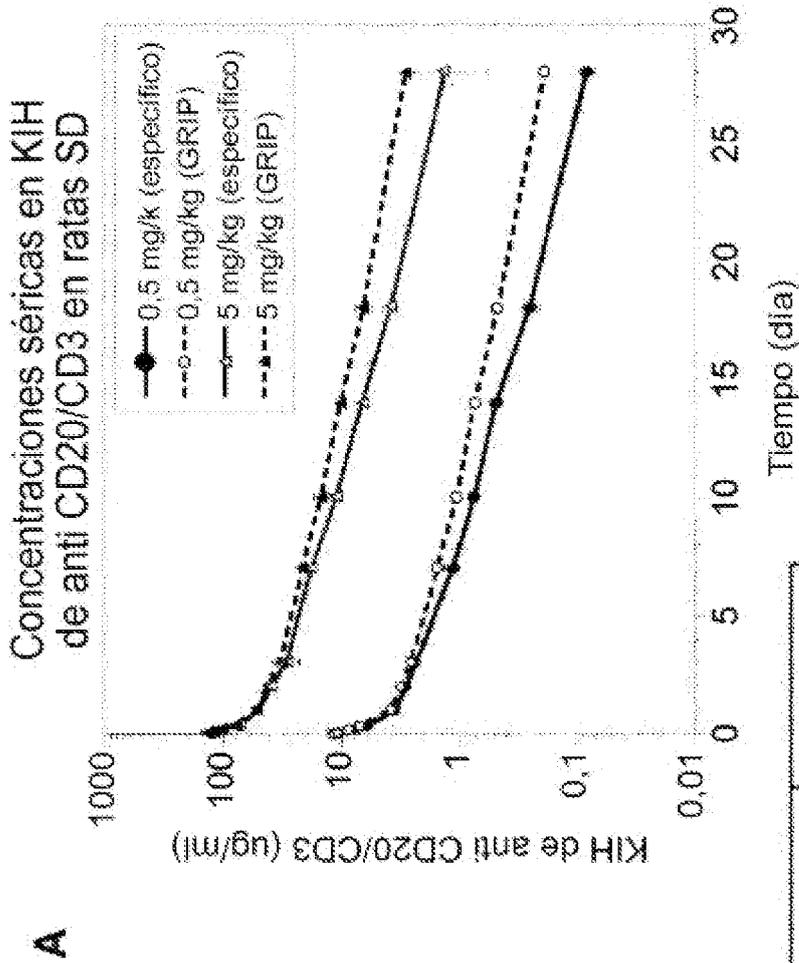
Figura 52B

Análisis por MS: Solo se detectó anticuerpo heterodimérico (botón-ojal)



**Figuras 53A-53B**

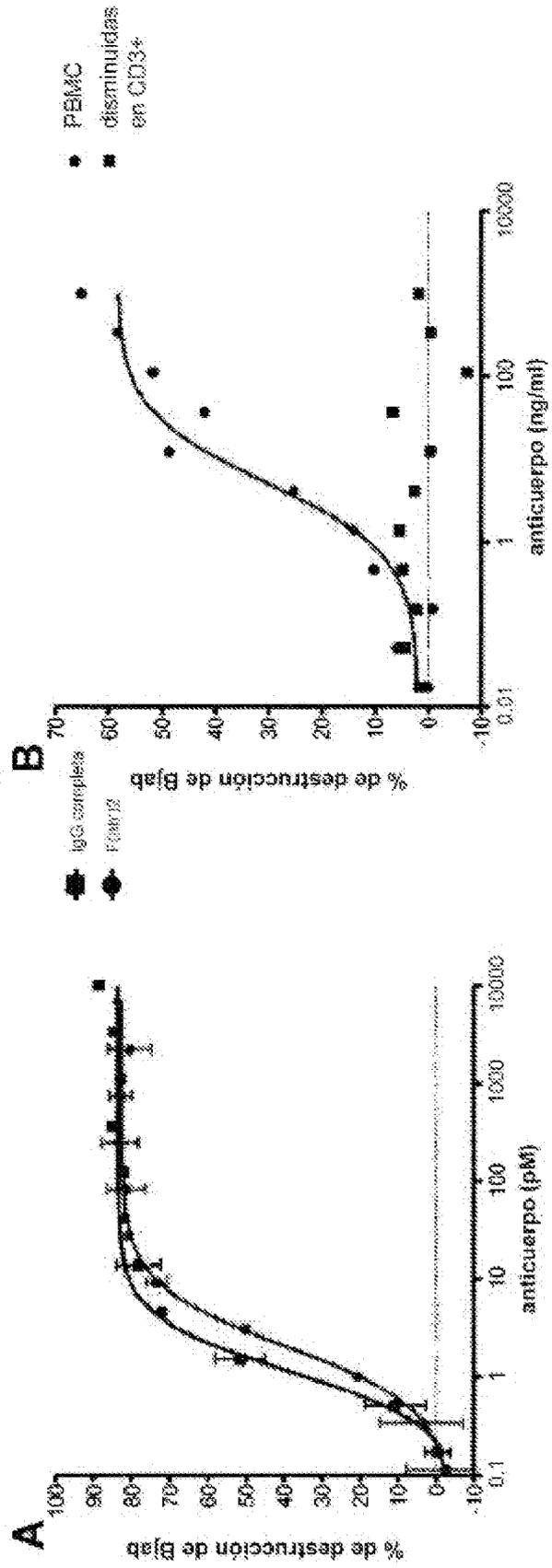
**Análisis FC en ratas para TDB frente a CD20**



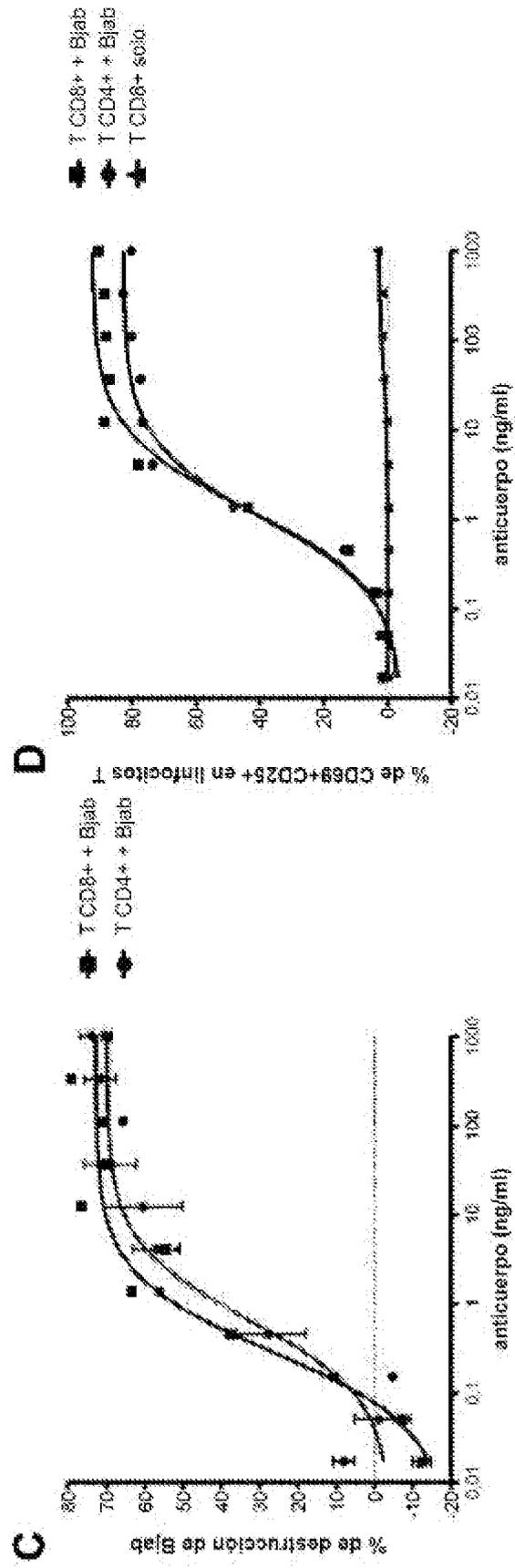
**B**

Desis	Ensayo	C <sub>máx.</sub> (ug/ml)	CL (ml/día/kg)	HL beta (día)
0.5	GRIP	12,0 ± 0,600	14,1 ± 0,255	6,08 ± 0,116
5	GRIP	139 ± 20,6	10,5 ± 0,942	6,40 ± 0,572
0.5	Específico	11,9 ± 0,638	18,5 ± 0,529	4,62 ± 0,185
5	Específico	197 ± 18,2	13,3 ± 1,14	4,98 ± 0,400

Figuras 54A-54B



Figuras 54C-54D



Figuras 54E-54F

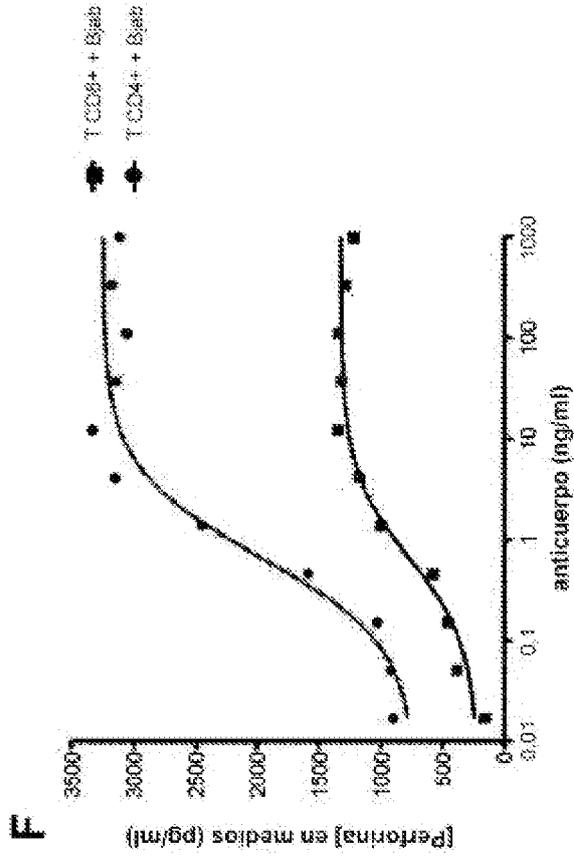
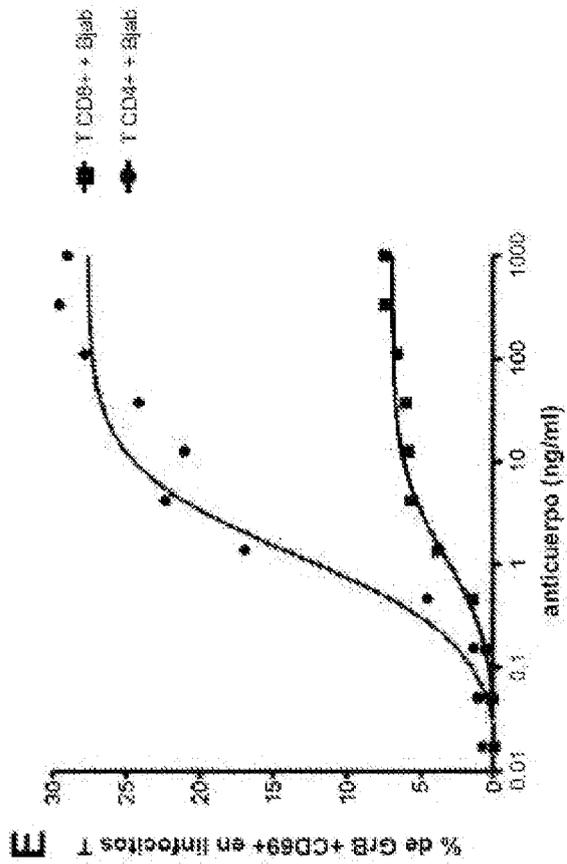


Figura 55

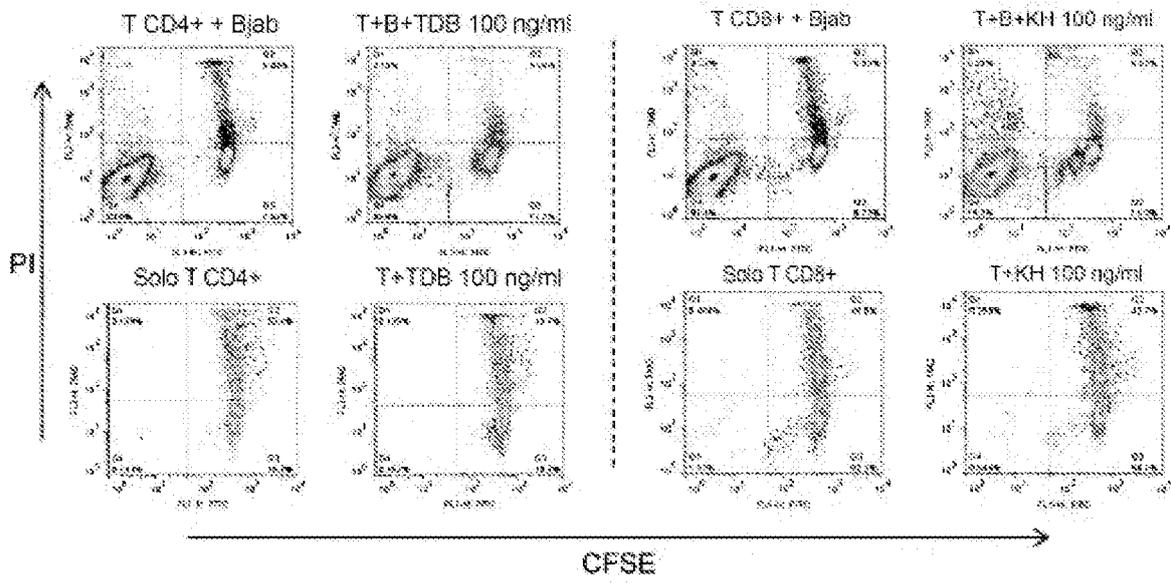


Figura 56A

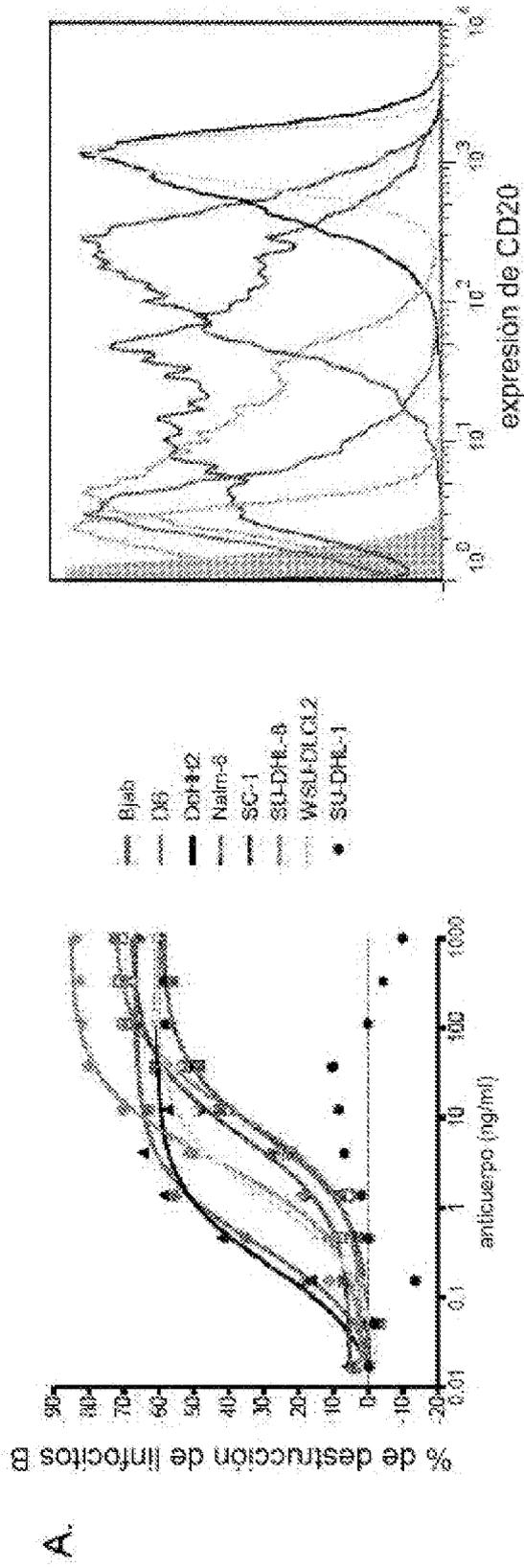
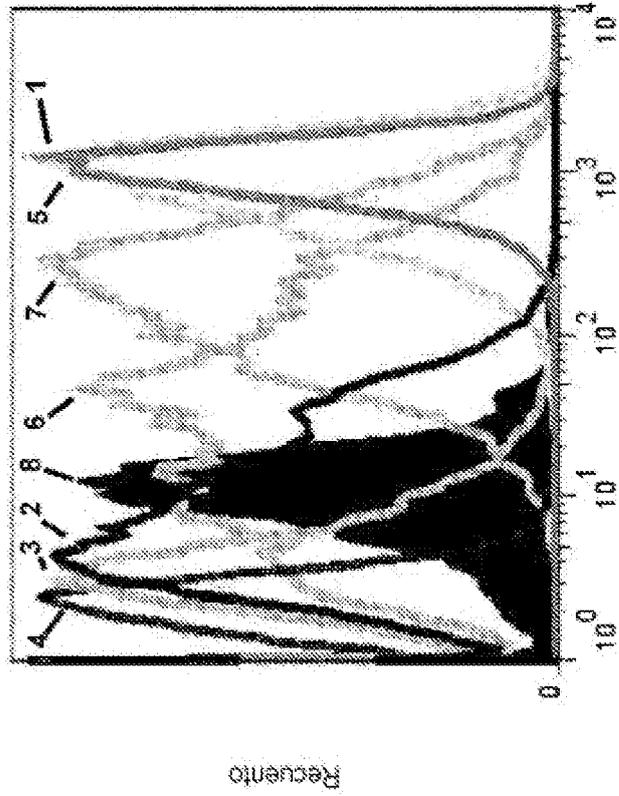


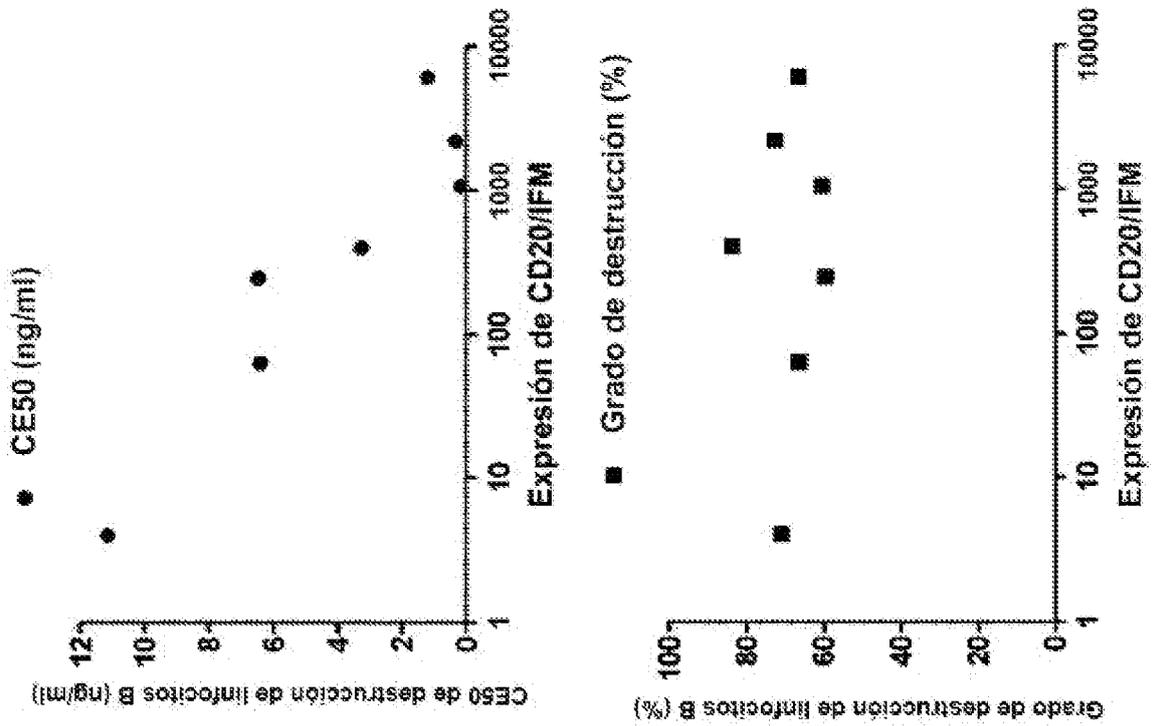
Figura 56B



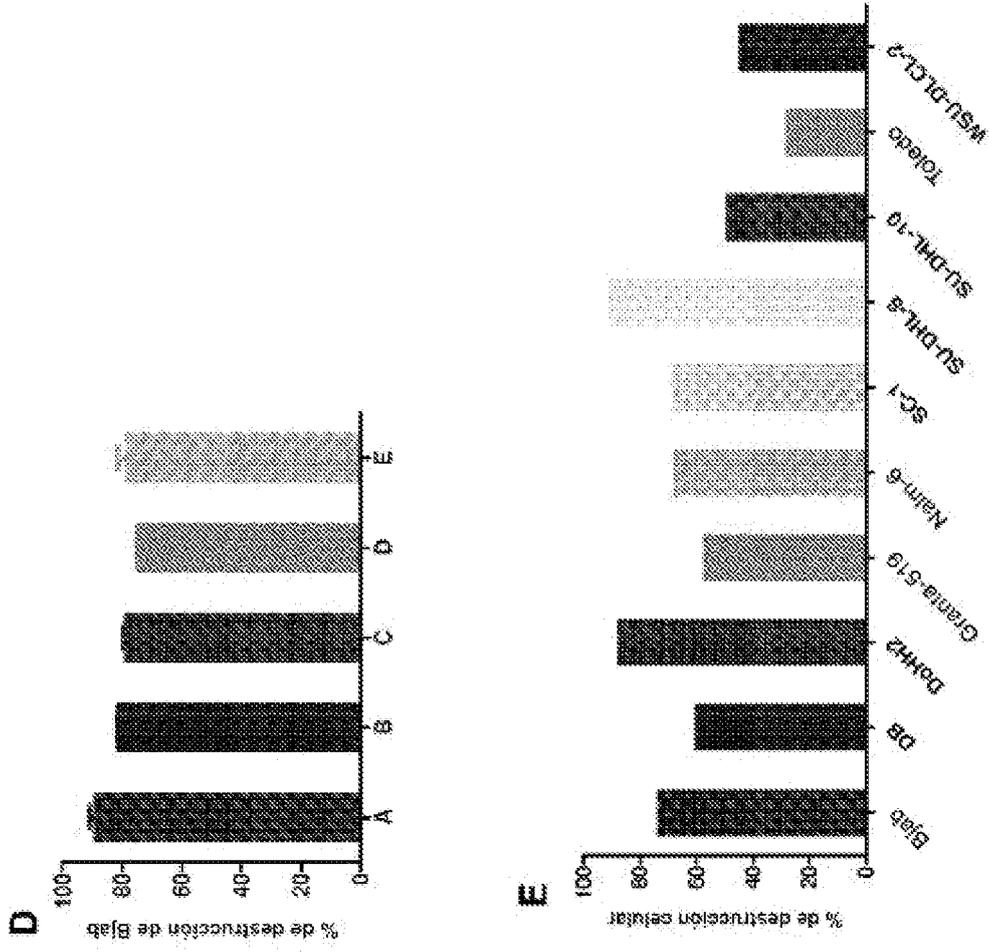
FL2-H: PE

	Nombre de muestra	Media A-FL2
1	LS20110307-WSU-DLCL2-CD20PE.001	1081
2	LS20110307-SU-DHL-8-CD20PE.001	17.4
3	LS20110307-SC-1-CD20PE.001	6.03
4	LS20110307-Nalm-6-CD20PE.001	2.73
5	LS20110307-DoHH2-CD20PE.001	942
6	LS20110307-DB-CD20PE.001	107
7	LS20110307-Bjab-CD20PE.001	284
8	LS20110307-P8MC-CD20PE.001	16.9

Figura 56C

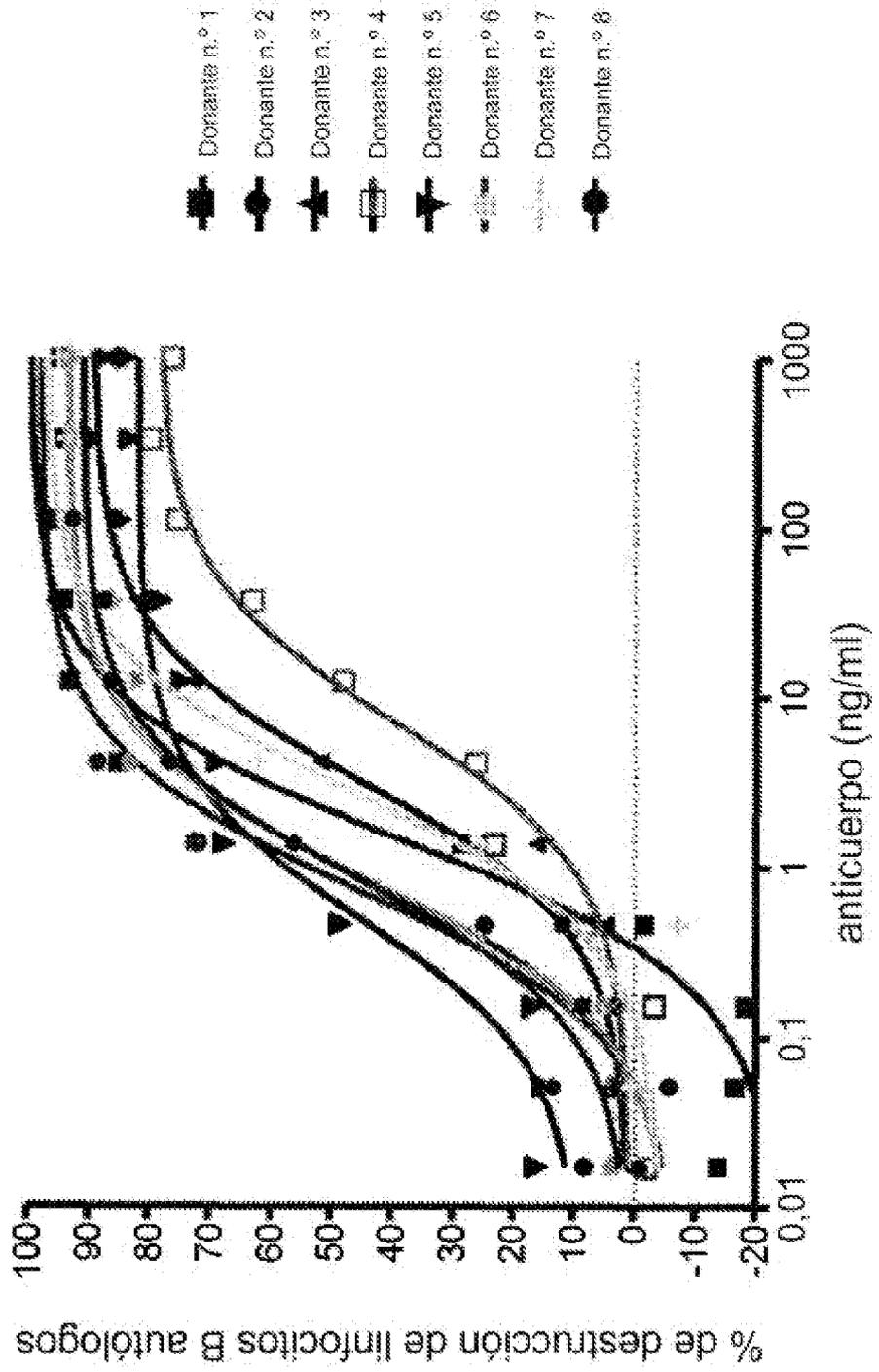


Figuras 56D-56E



Linfocitos B con linfocitos T CD8+ purificados

Figura 56F



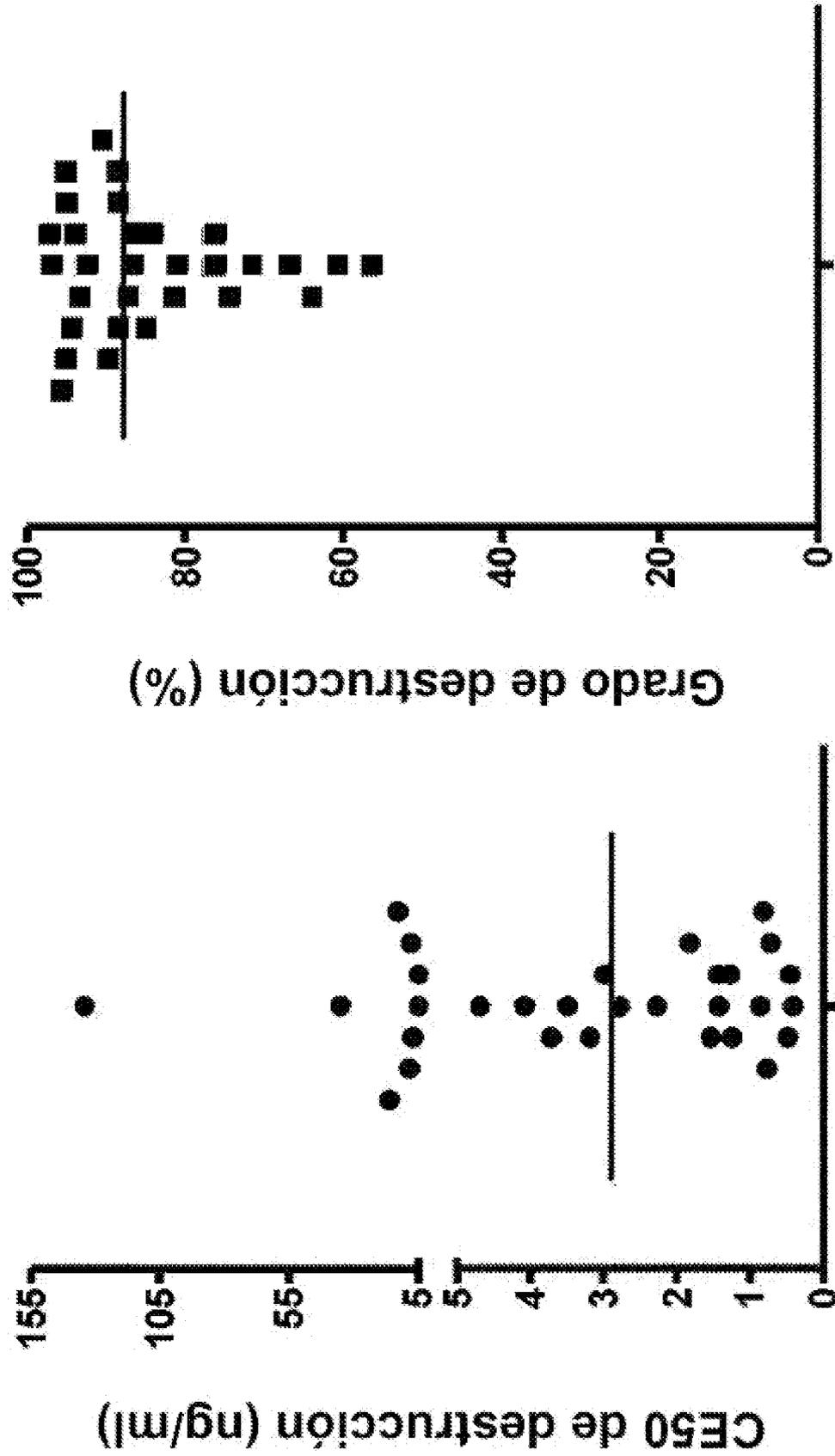


Figura 56G

Figura 56H

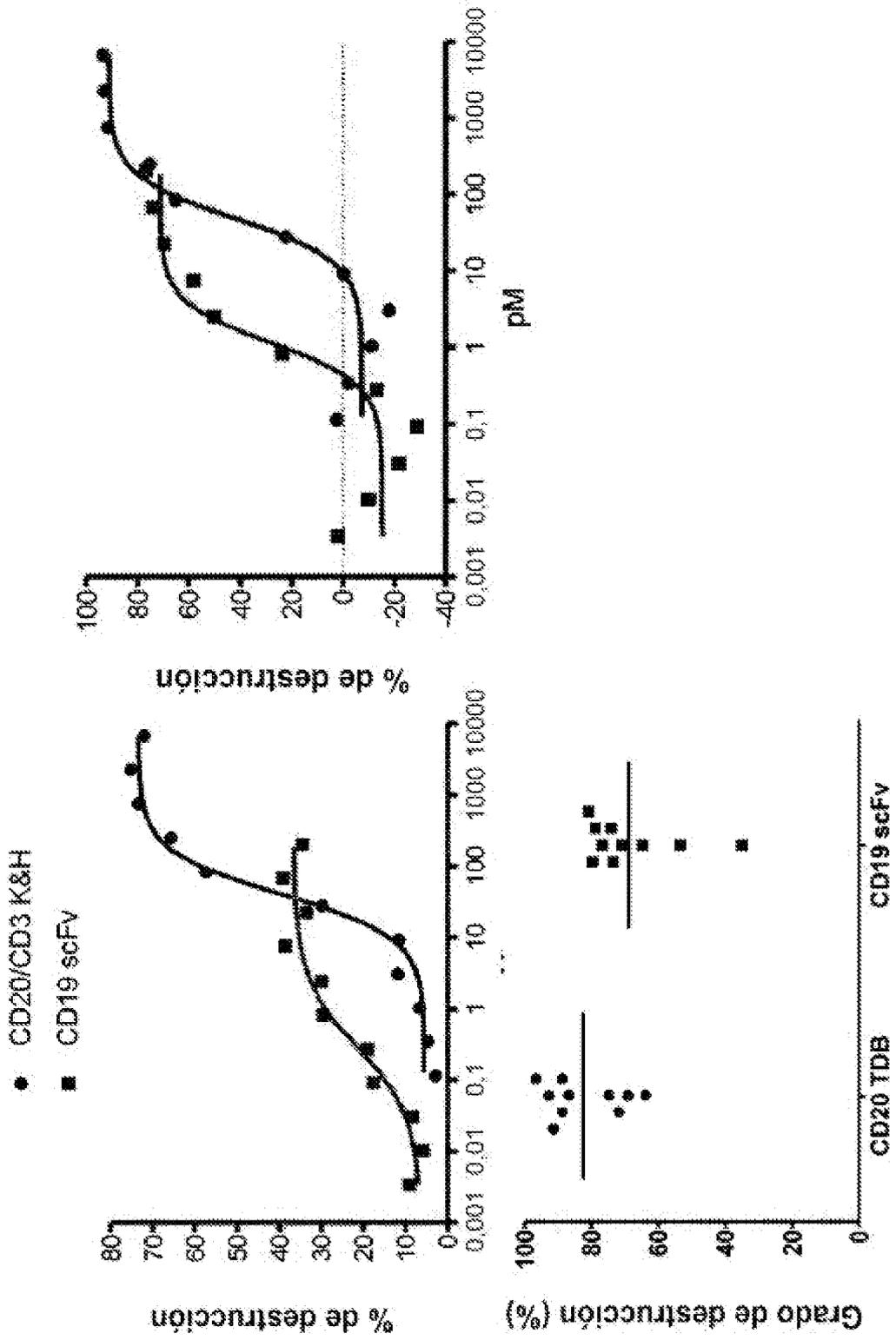
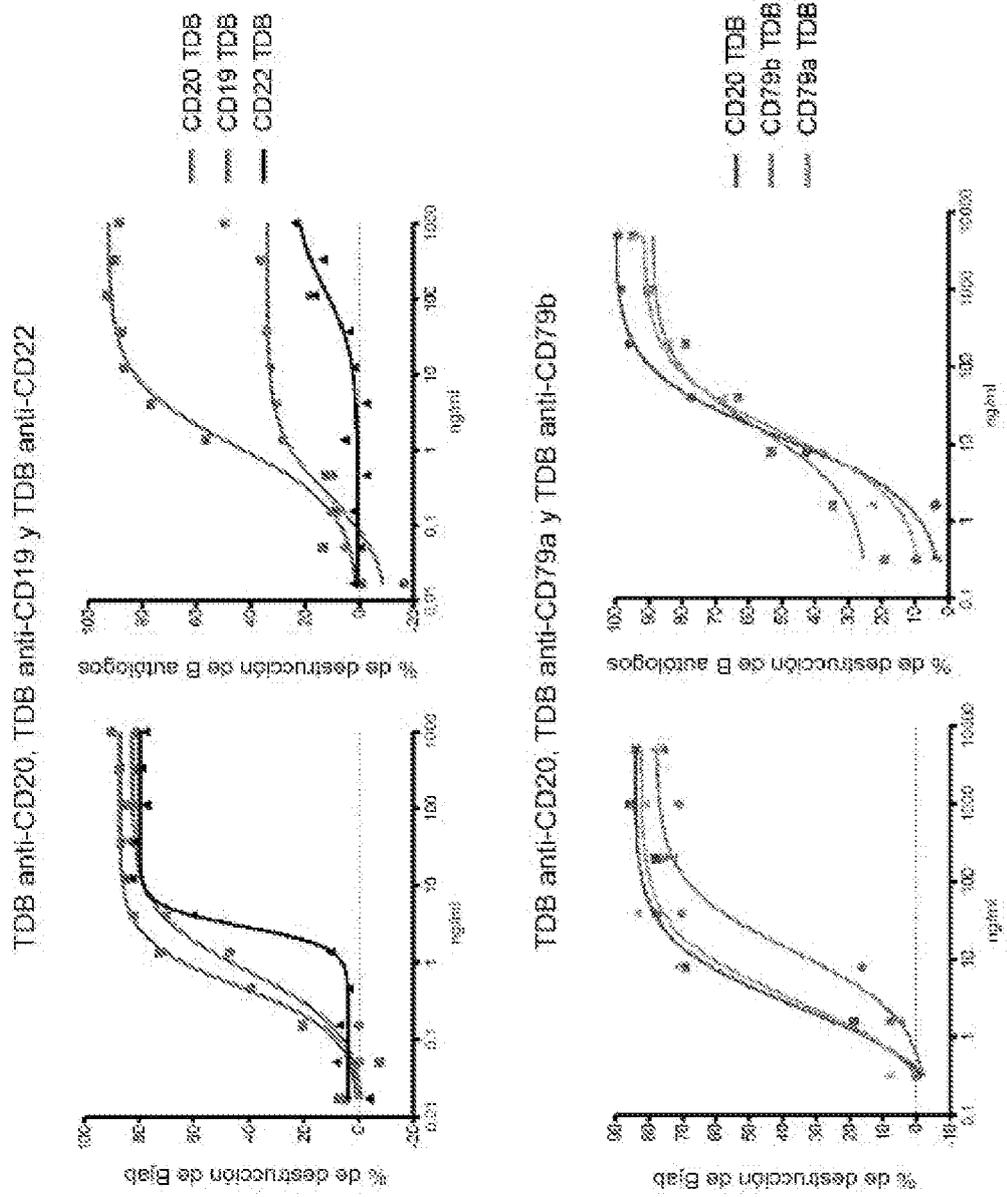


Figura 56I



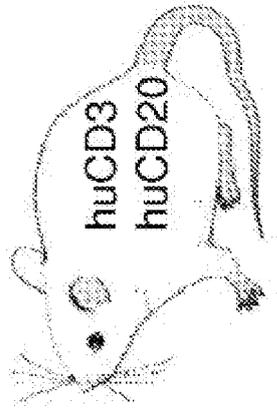
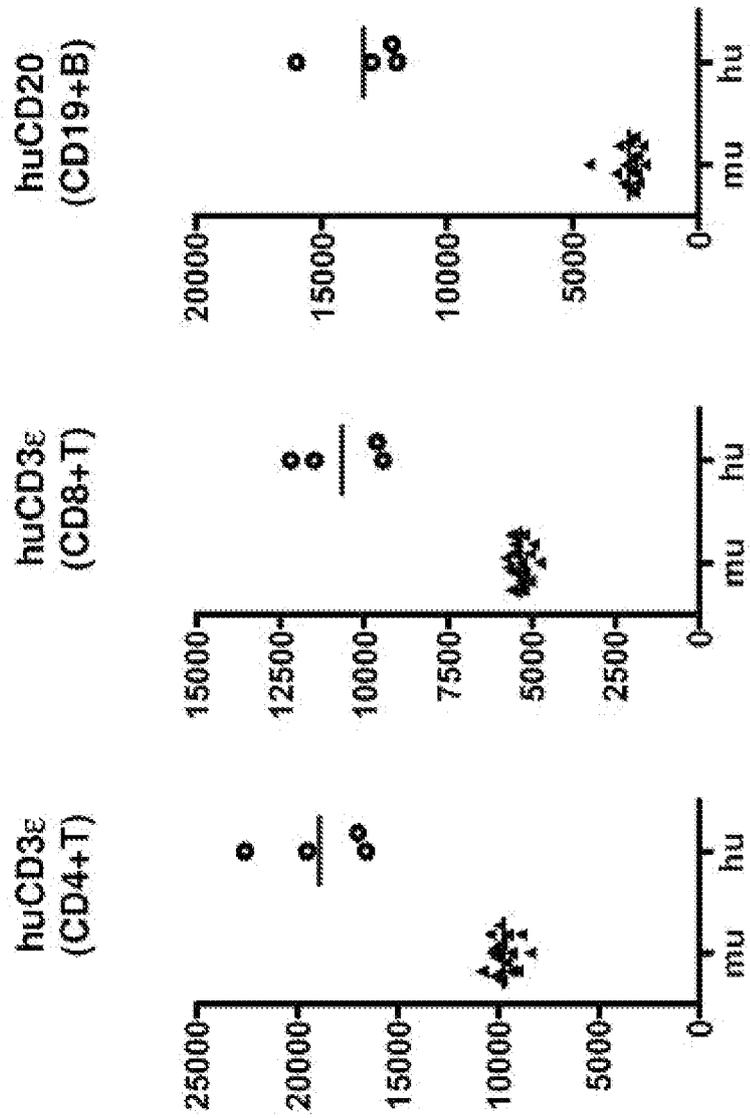


Figura 57A



**Figuras 57B-57C**

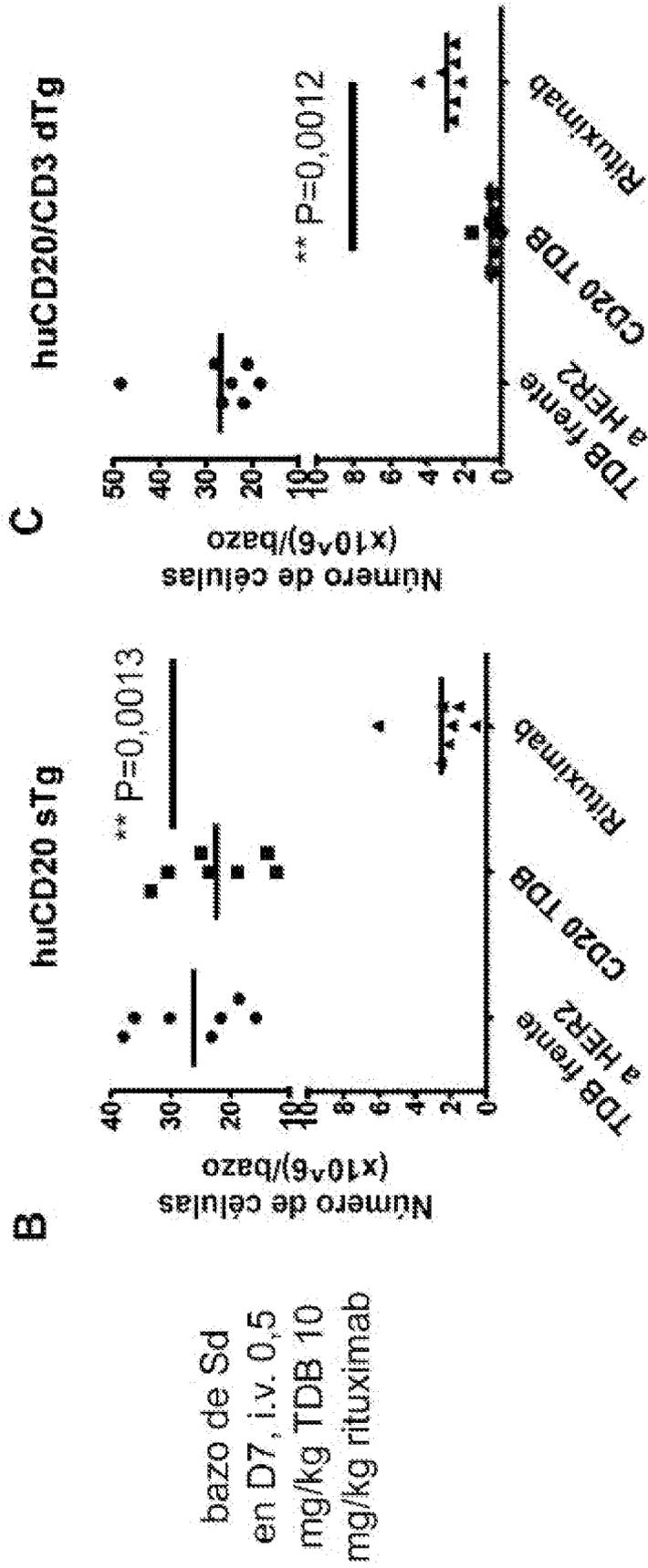


Figura 58A

Respuesta a la dosis; linfocitos B en sangre

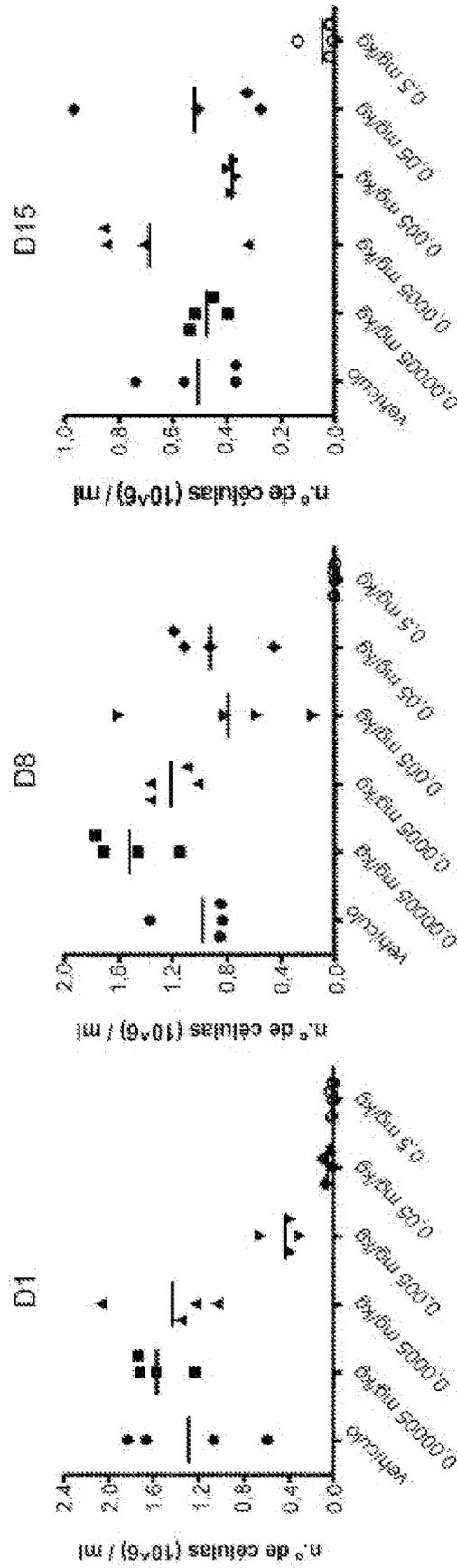
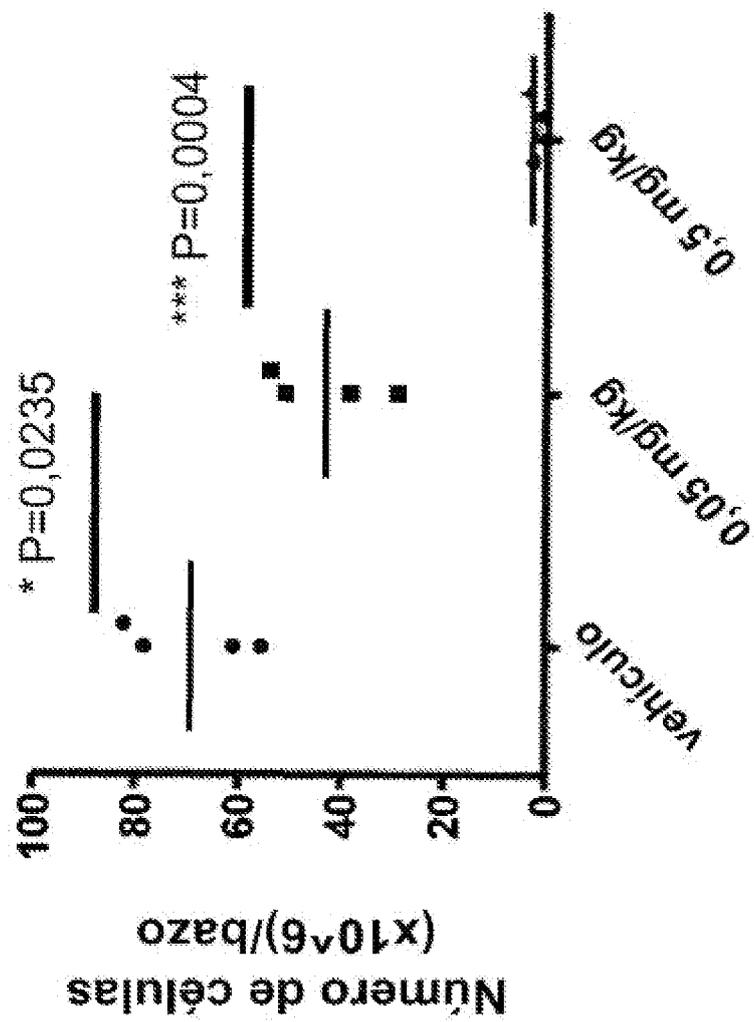


Figura 58B



Figuras 58C-58D

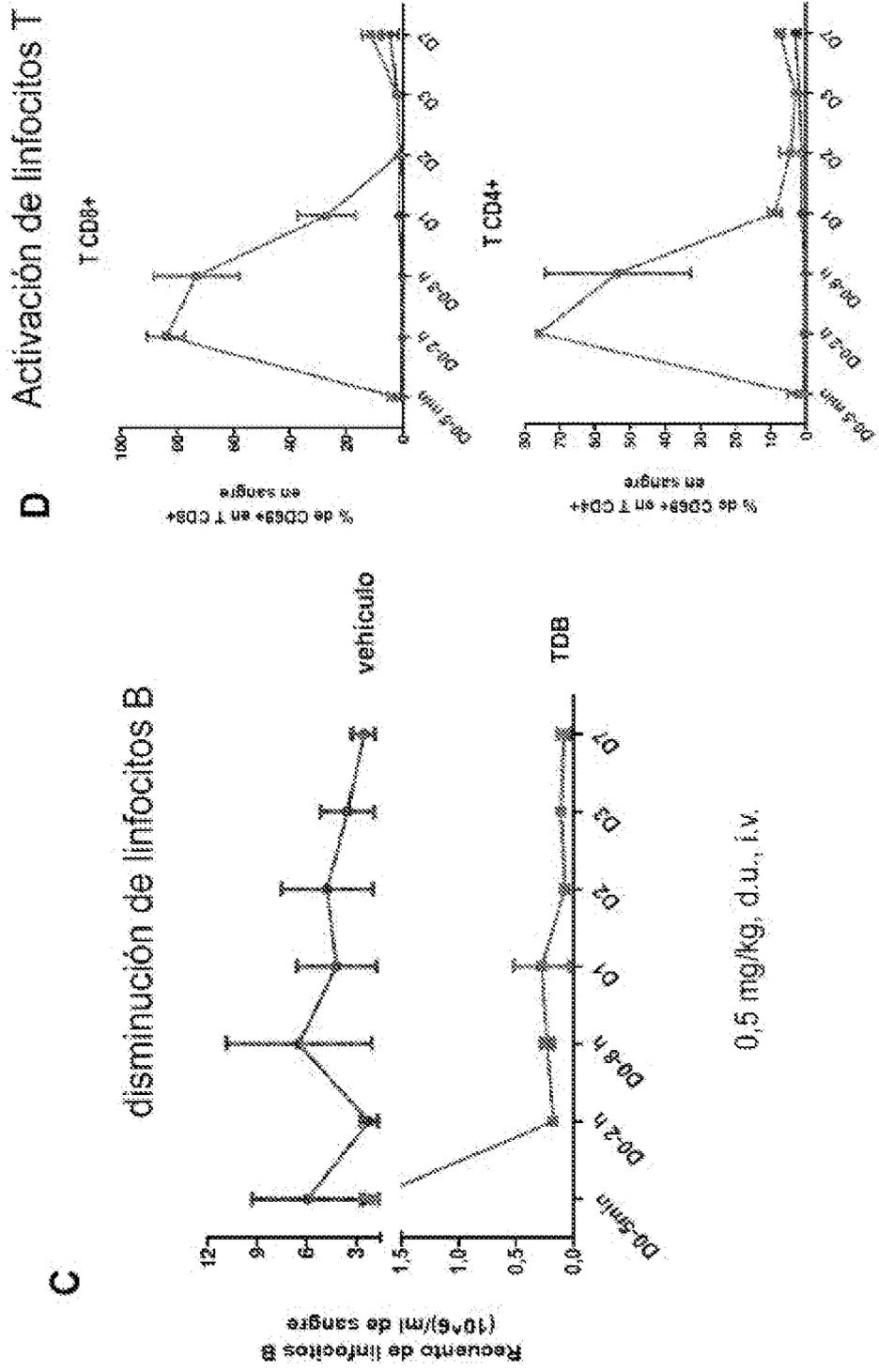
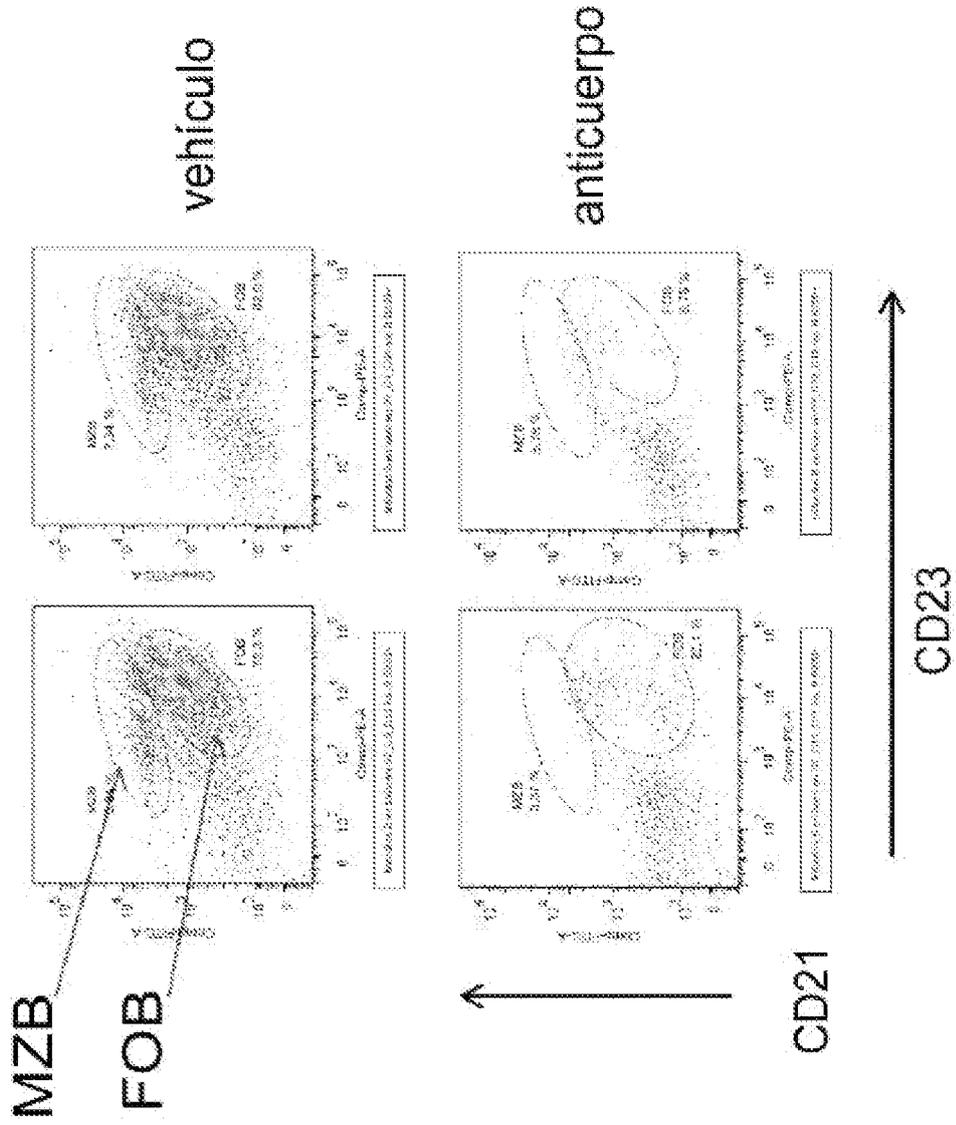
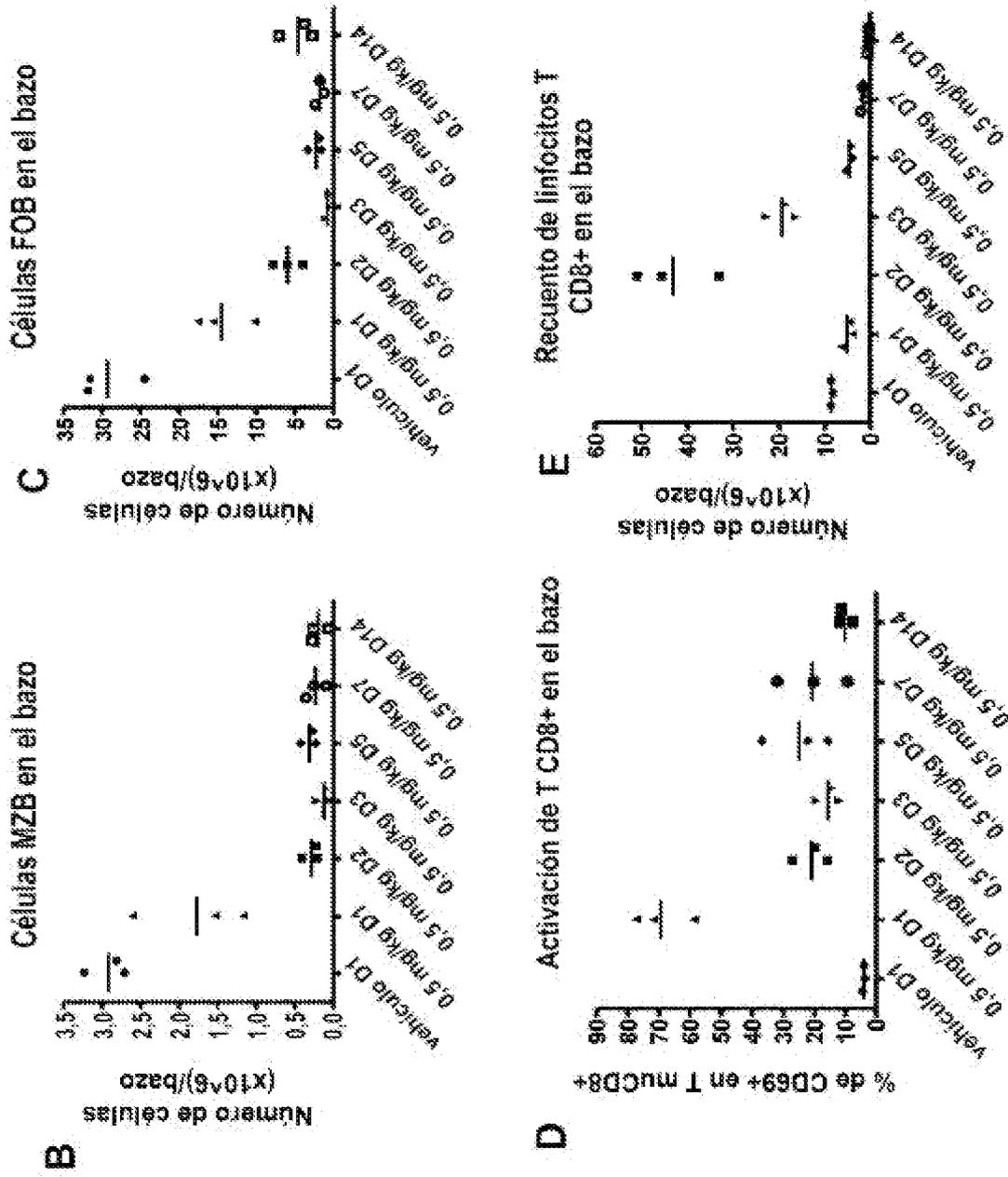


Figura 59A

TDB



Figuras 59B-59E



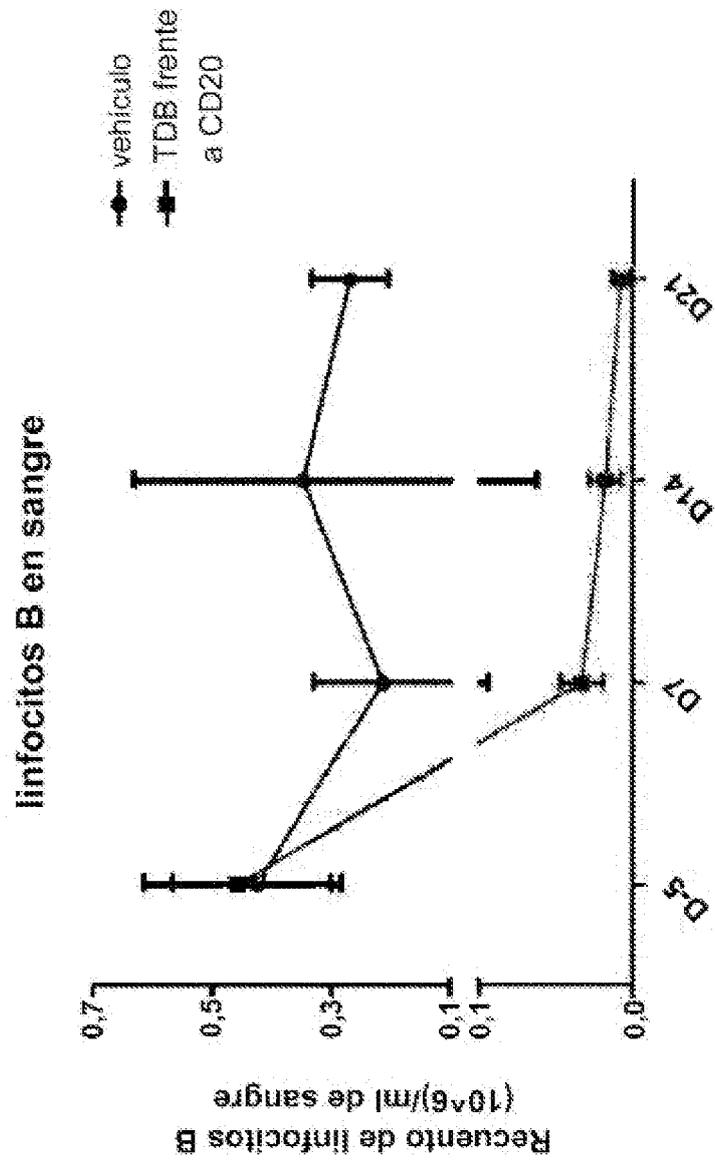


Figura 60A

Figura 60B

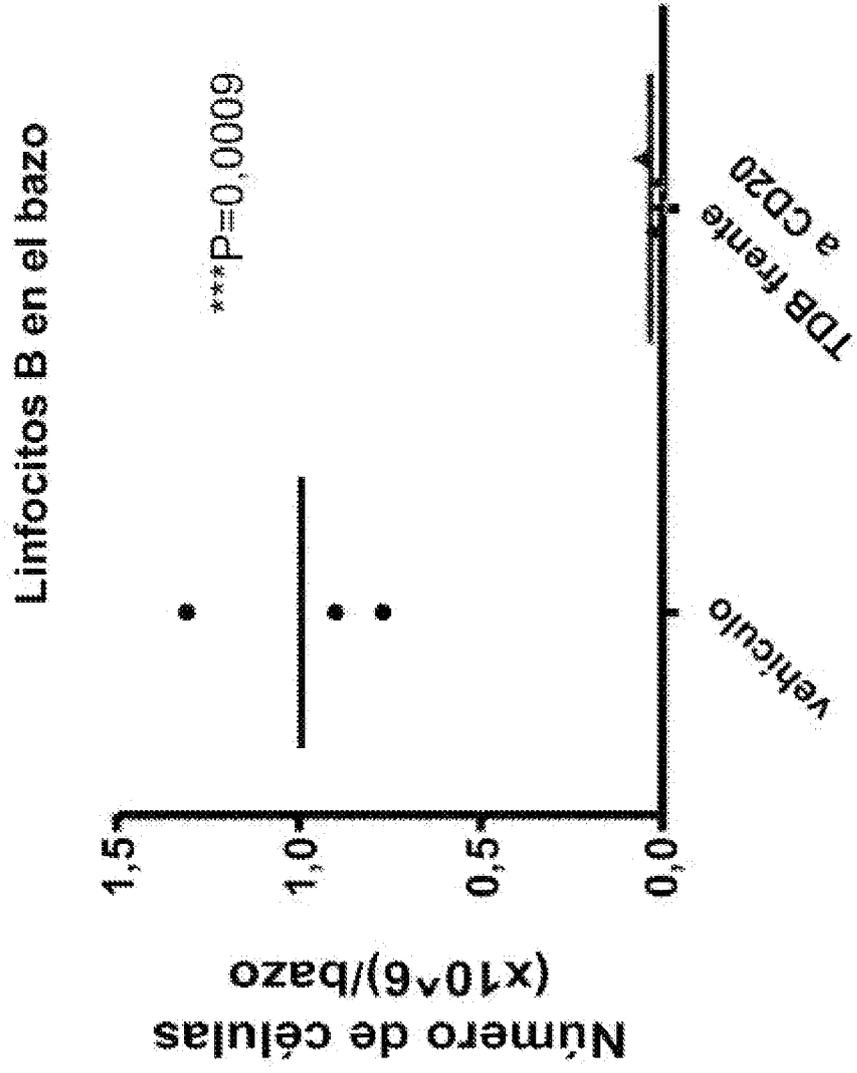
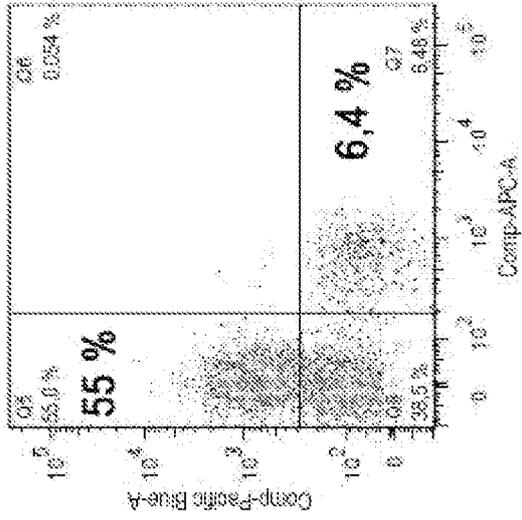
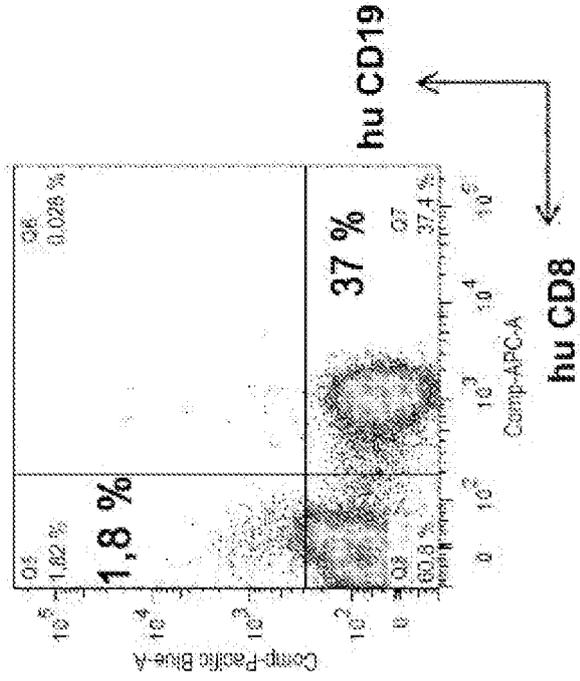


Figura 60C

Control  
baja proporción T:B



Proliferación de  
linfocitos T tras  
el tratamiento  
(D7, sangre)



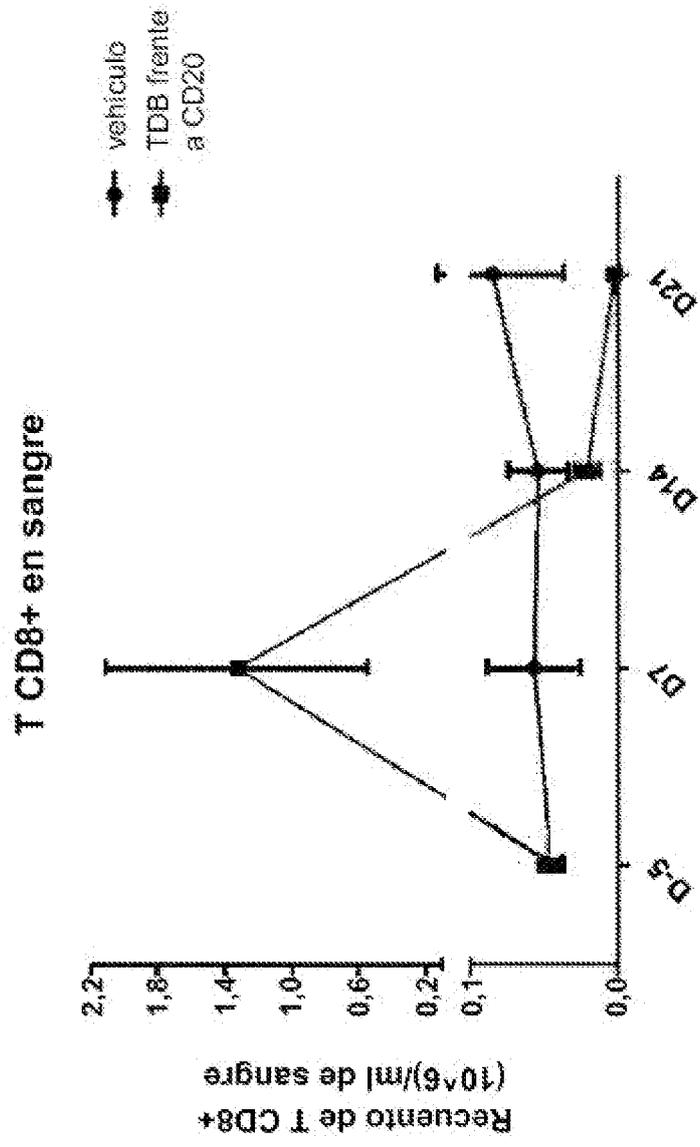
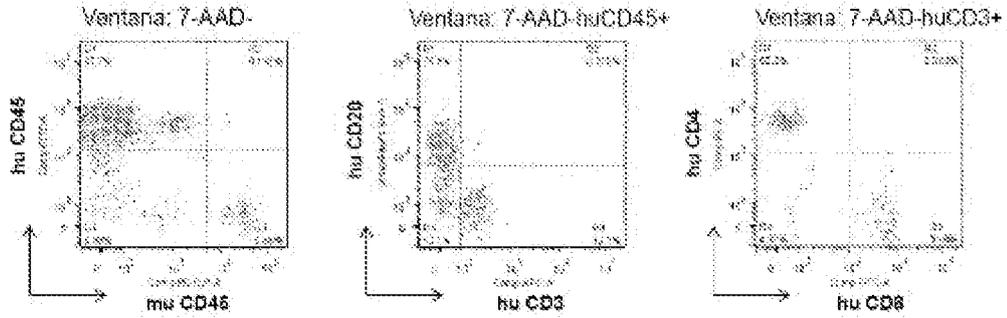


Figura 60D

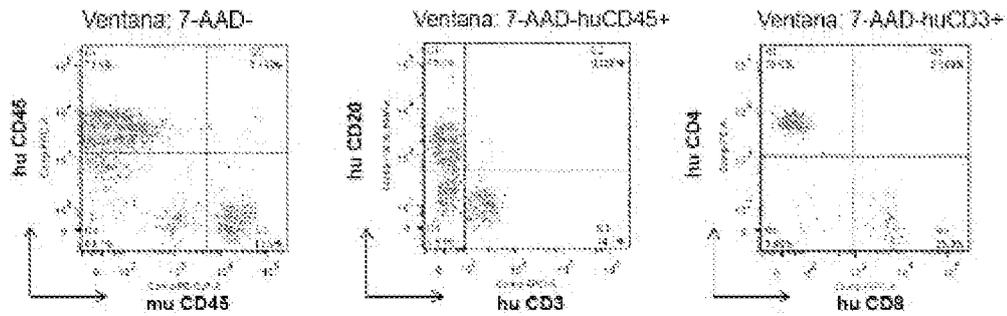
**Figuras 60E-60F**

**E**

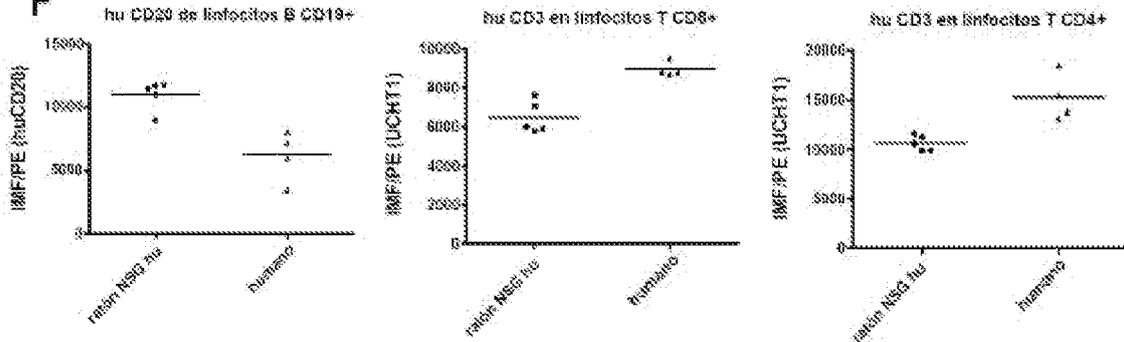
n.º 43: 76 % B huCD20+, 4,0 % T huCD8+ y 7,5 % T huCD4+ de células huCD45+



n.º 46: 75 % B huCD20+, 3,7 % T huCD8+ y 10 % T huCD4+ de células huCD45+.



**F**



Figuras 61A-61B

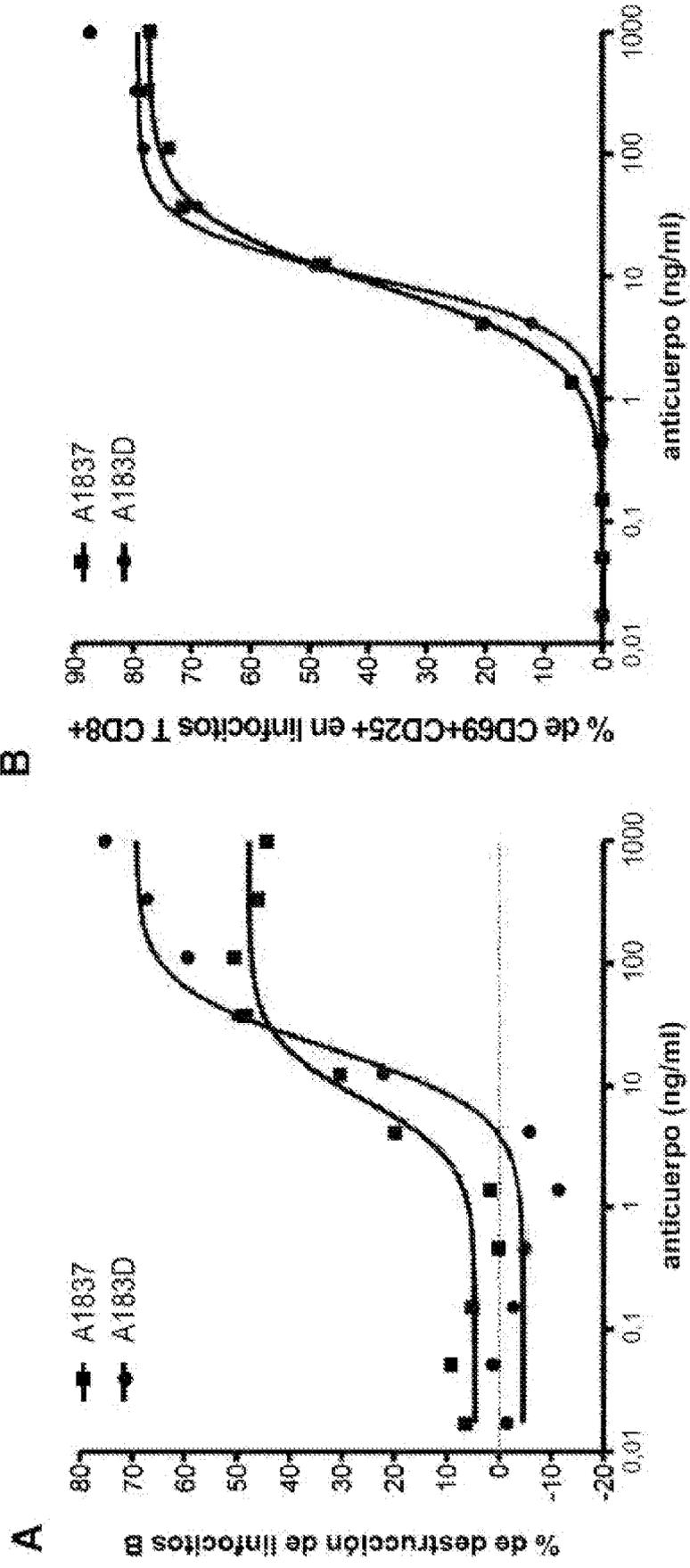


Figura 61C

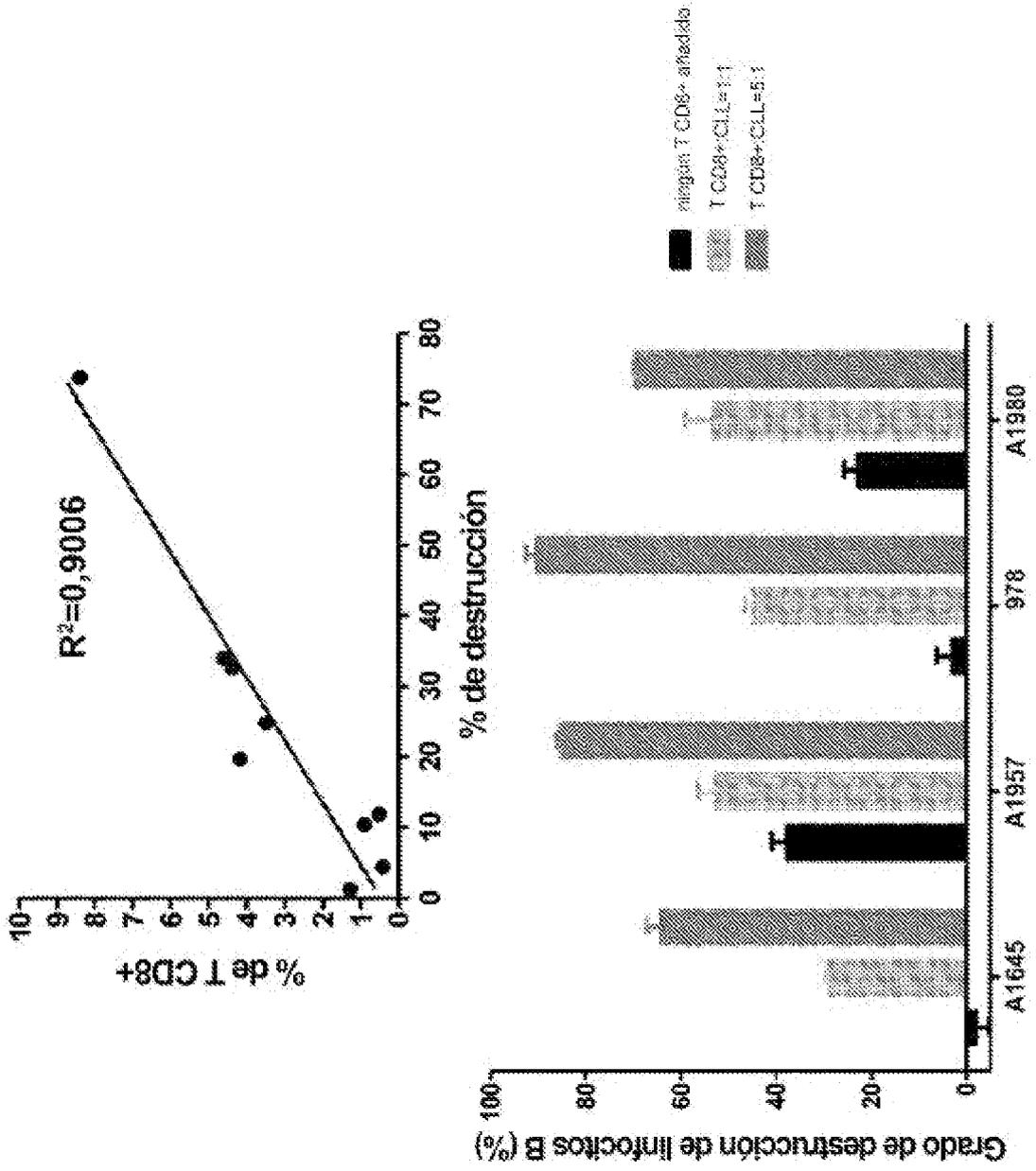
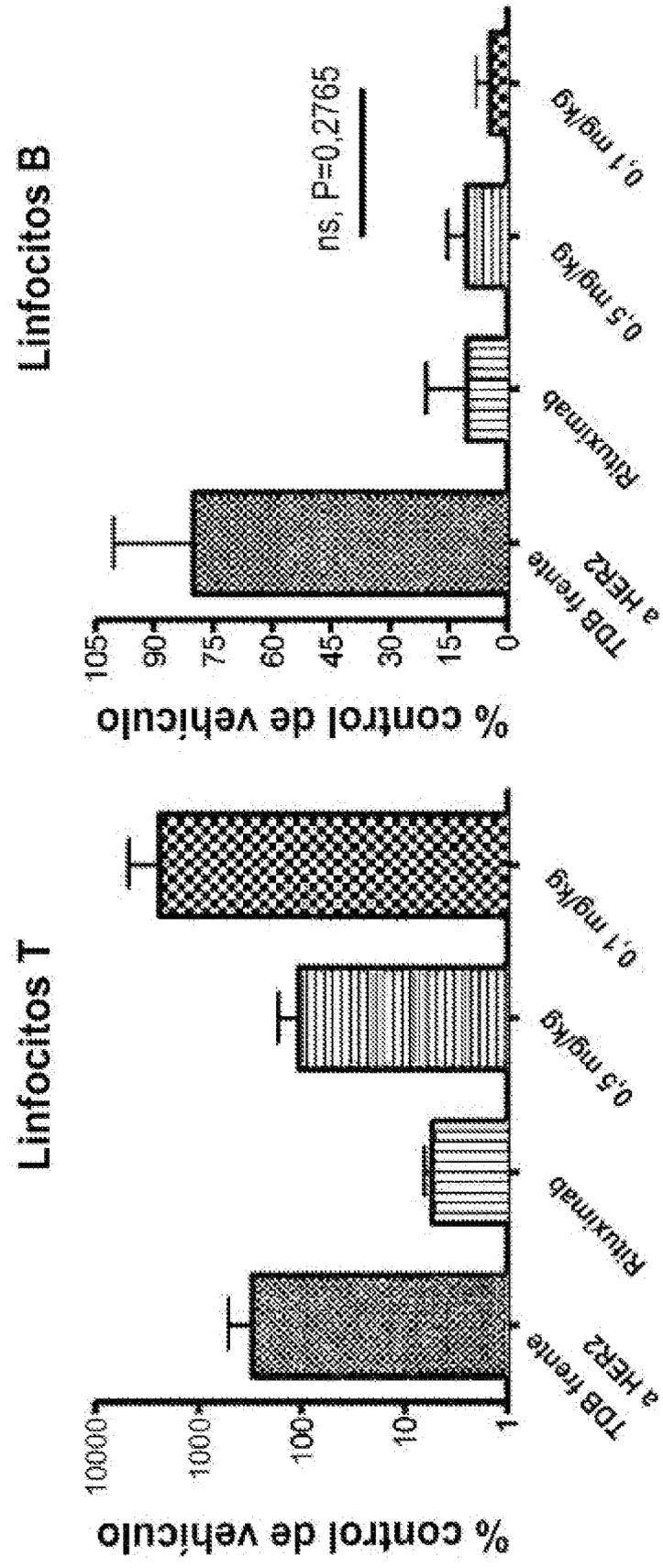


Figura 62A



**Figura 62B**

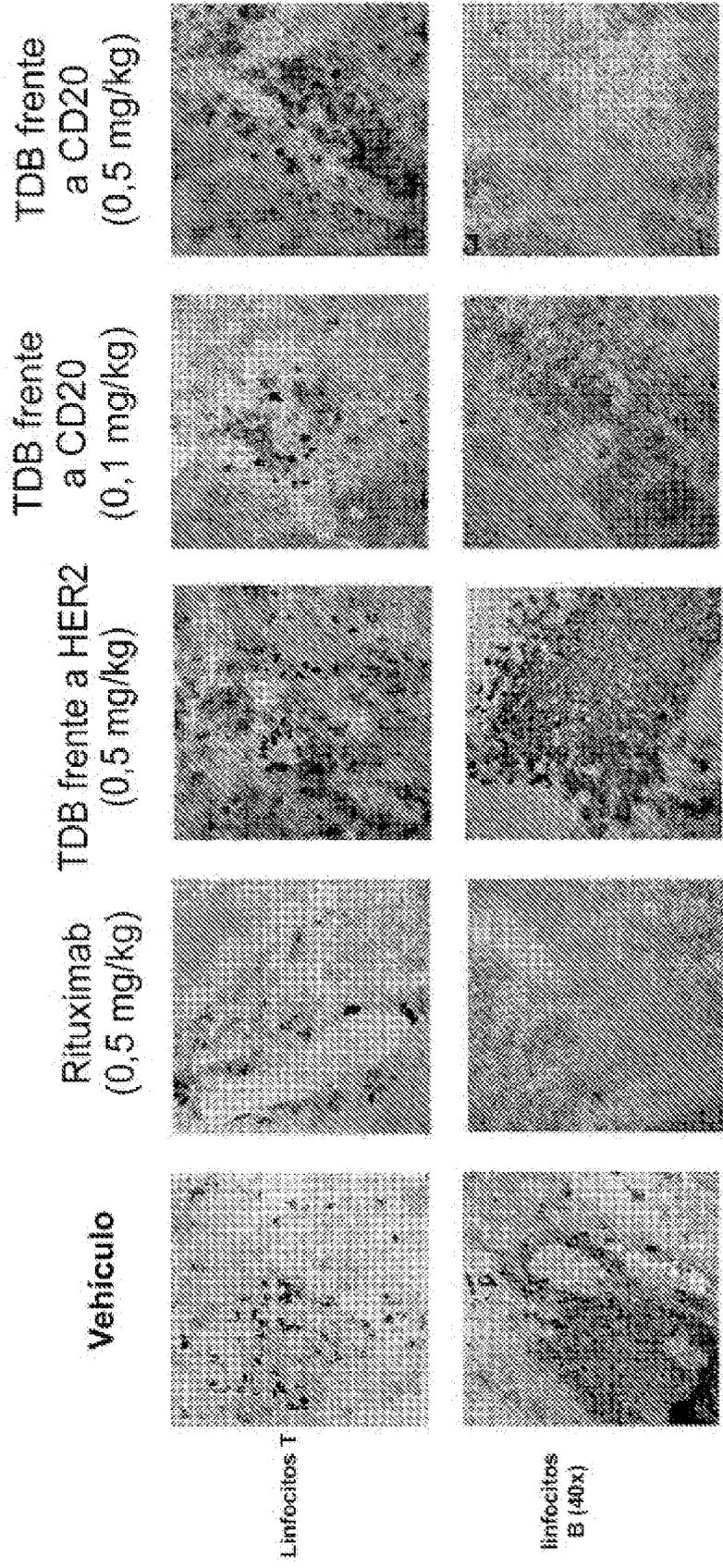
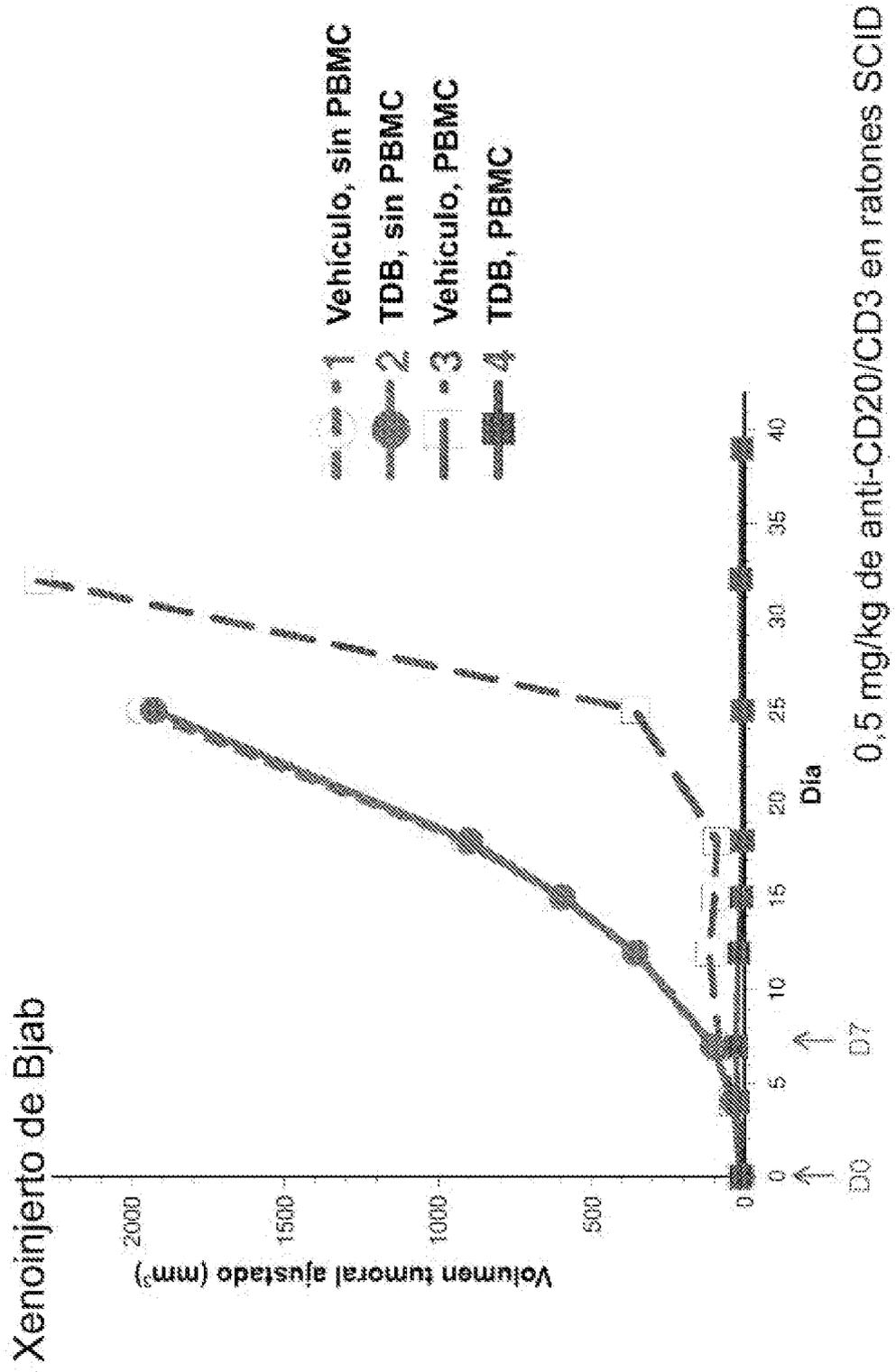


Figura 63



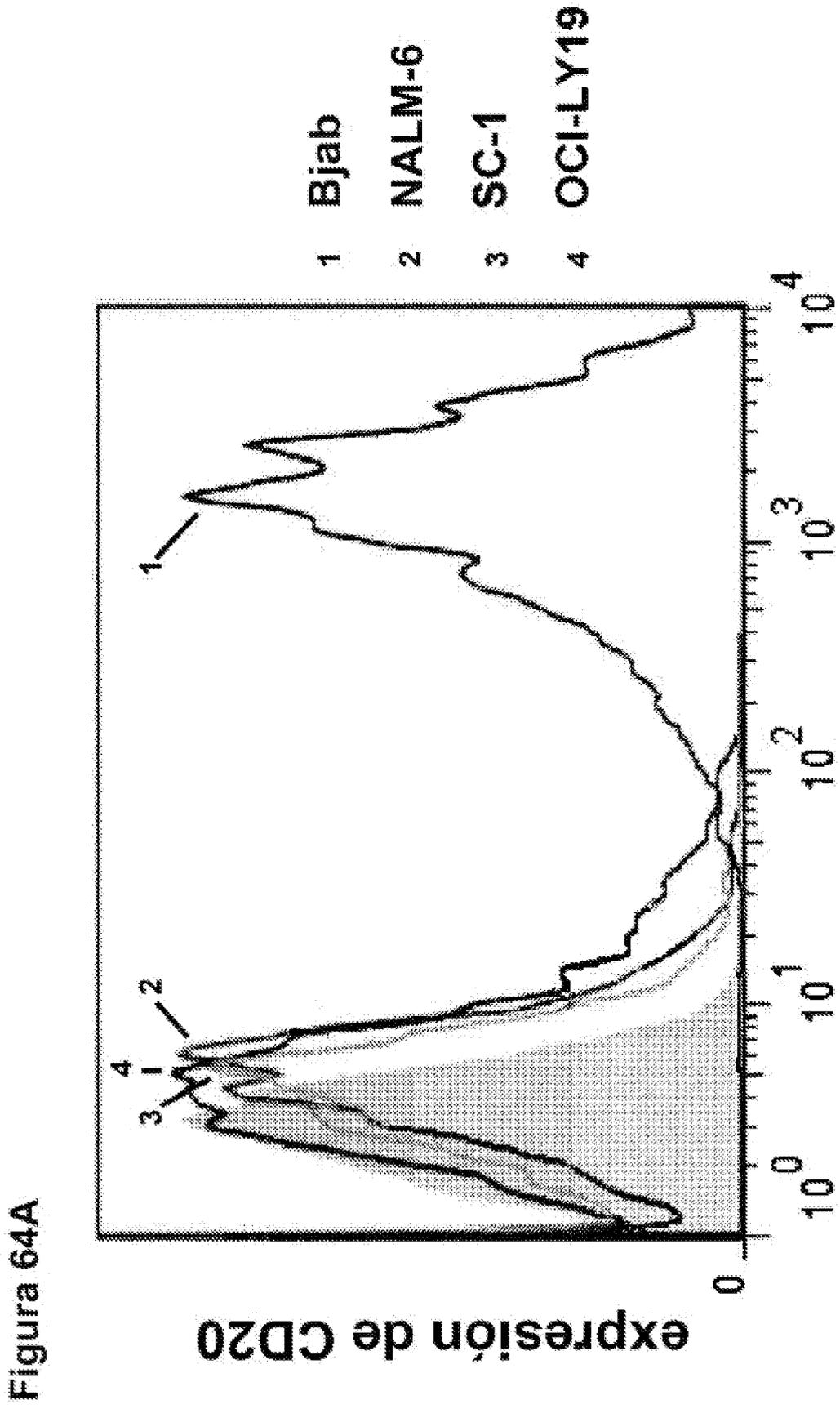


Figura 64B

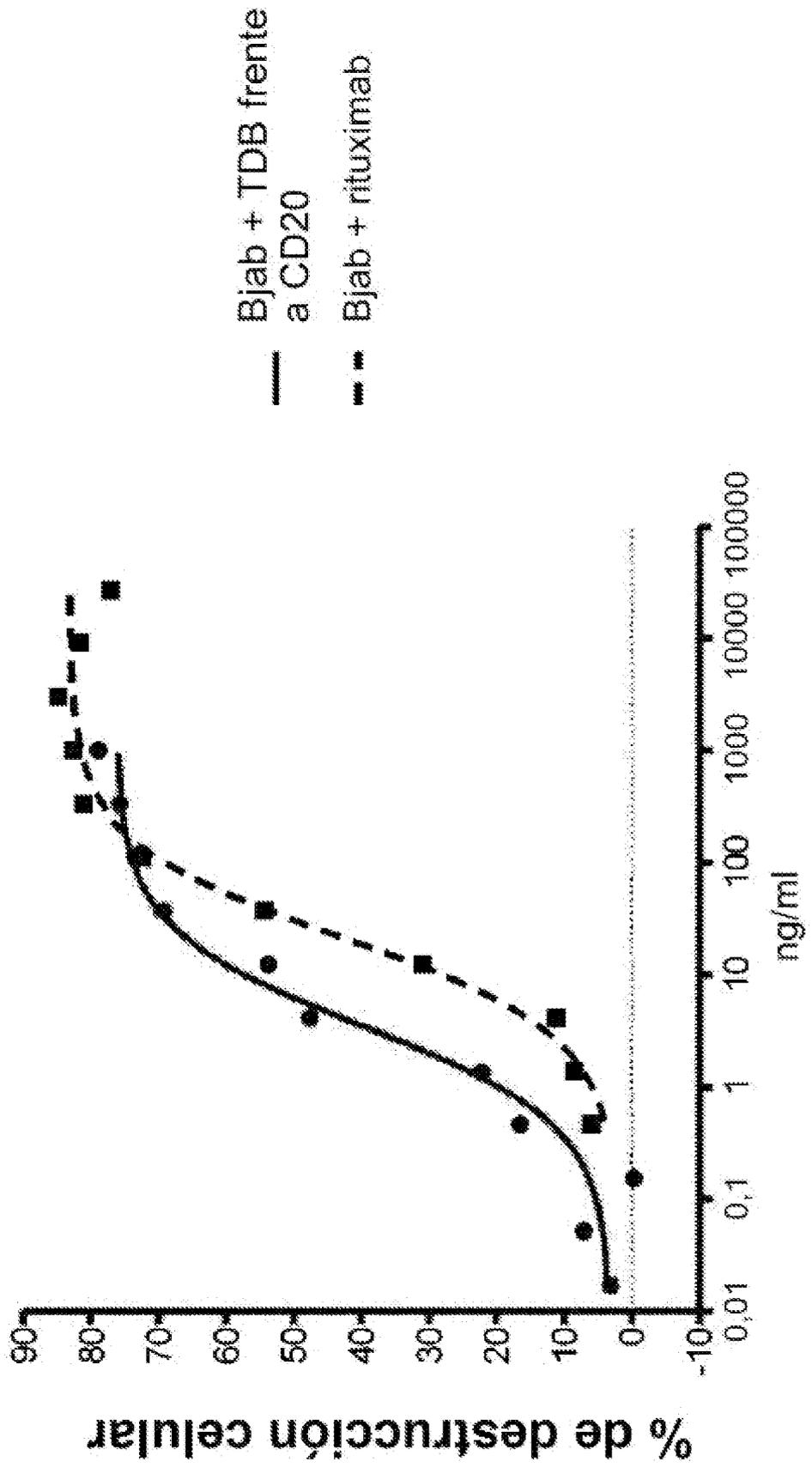


Figura 64C

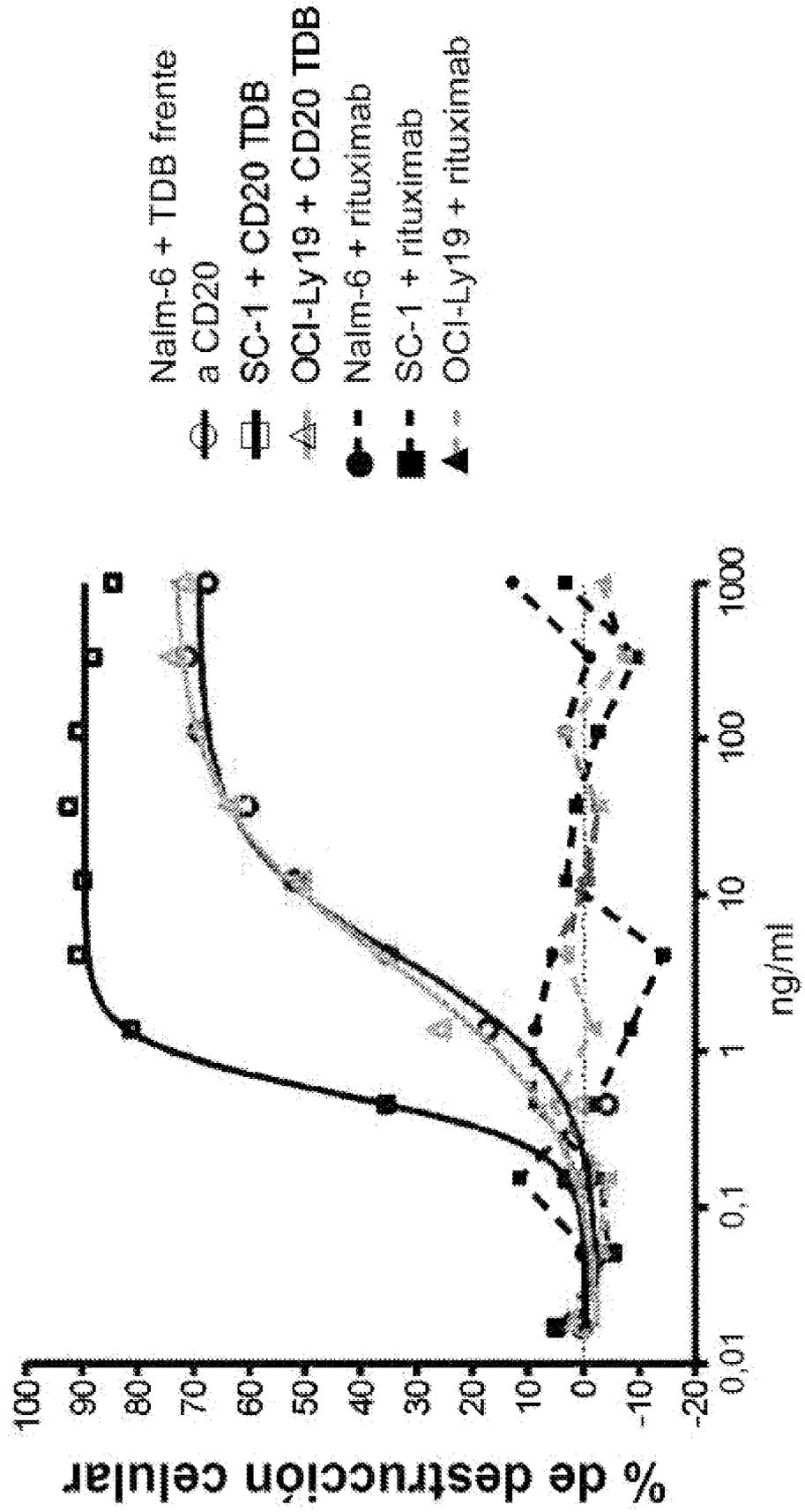


Figura 64D

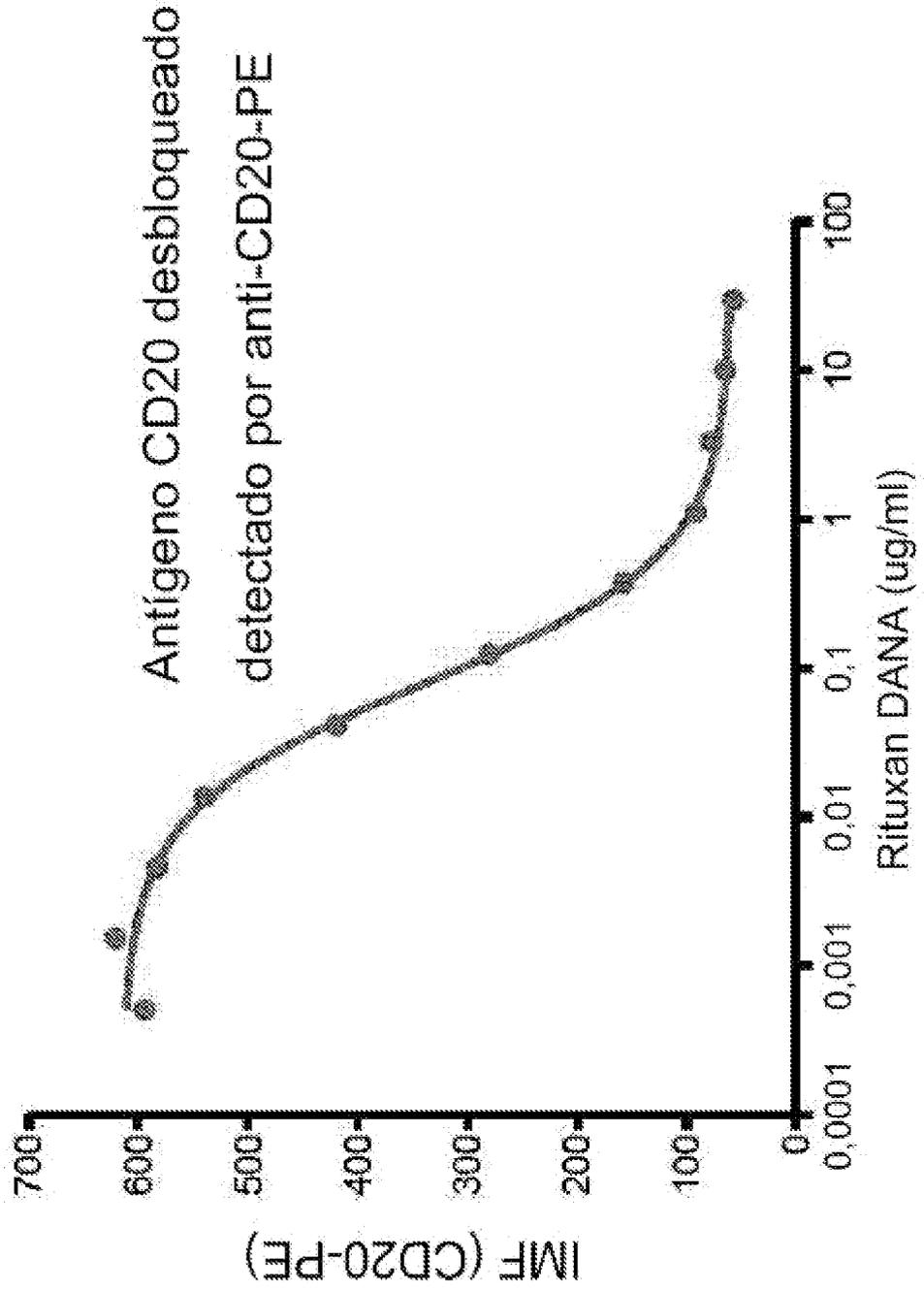


Figura 65A

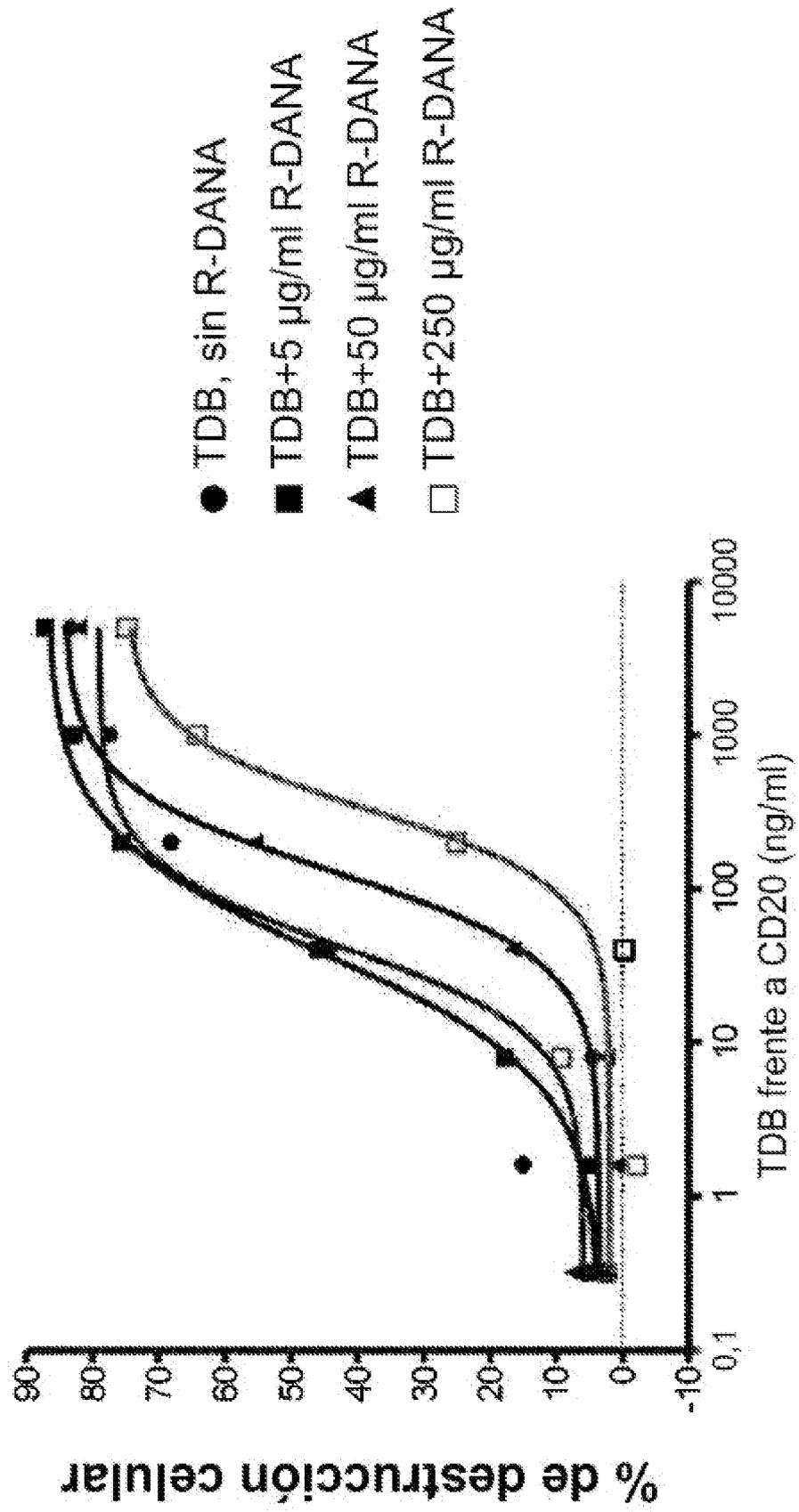


Figura 65B

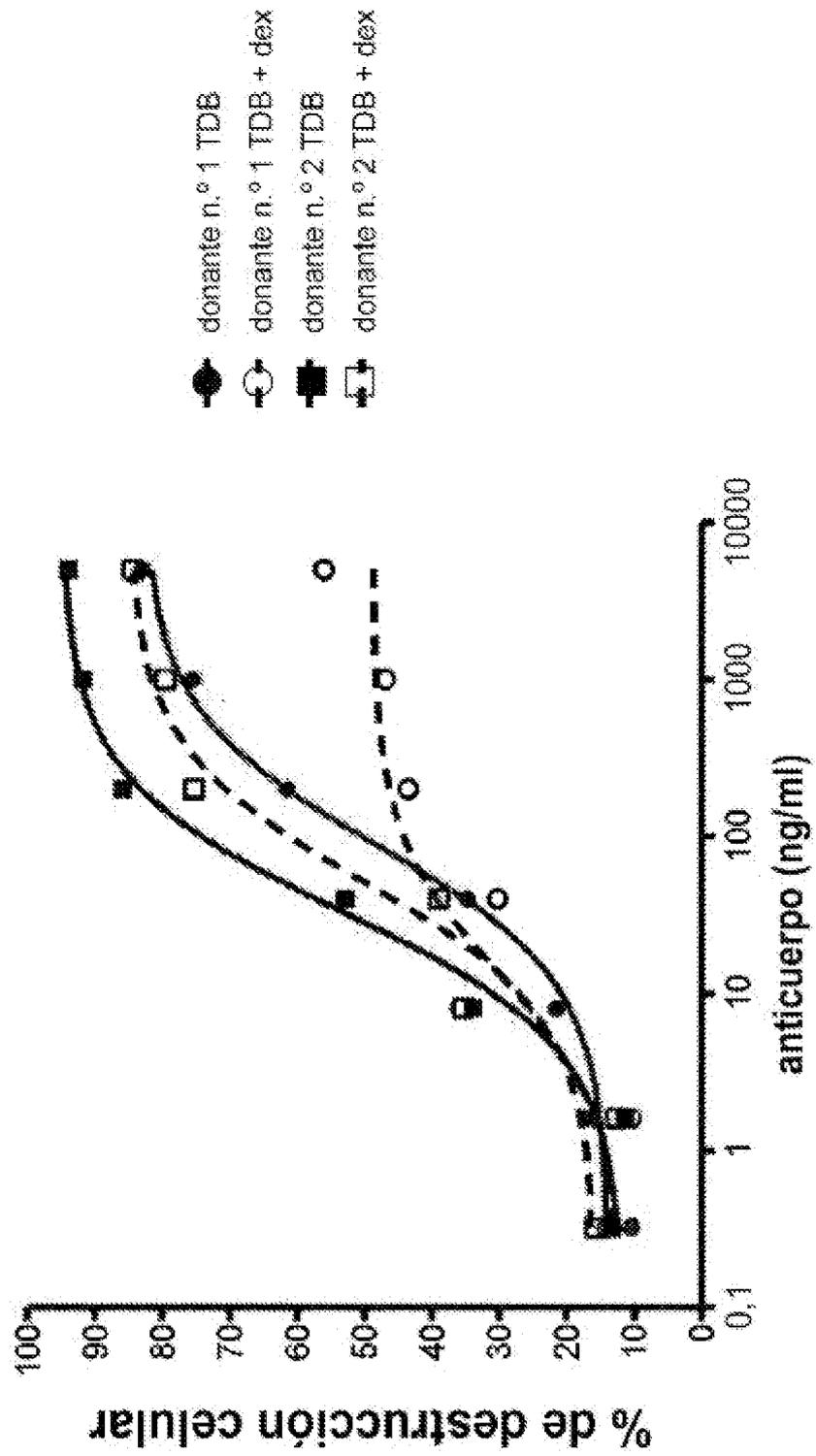


Figura 66

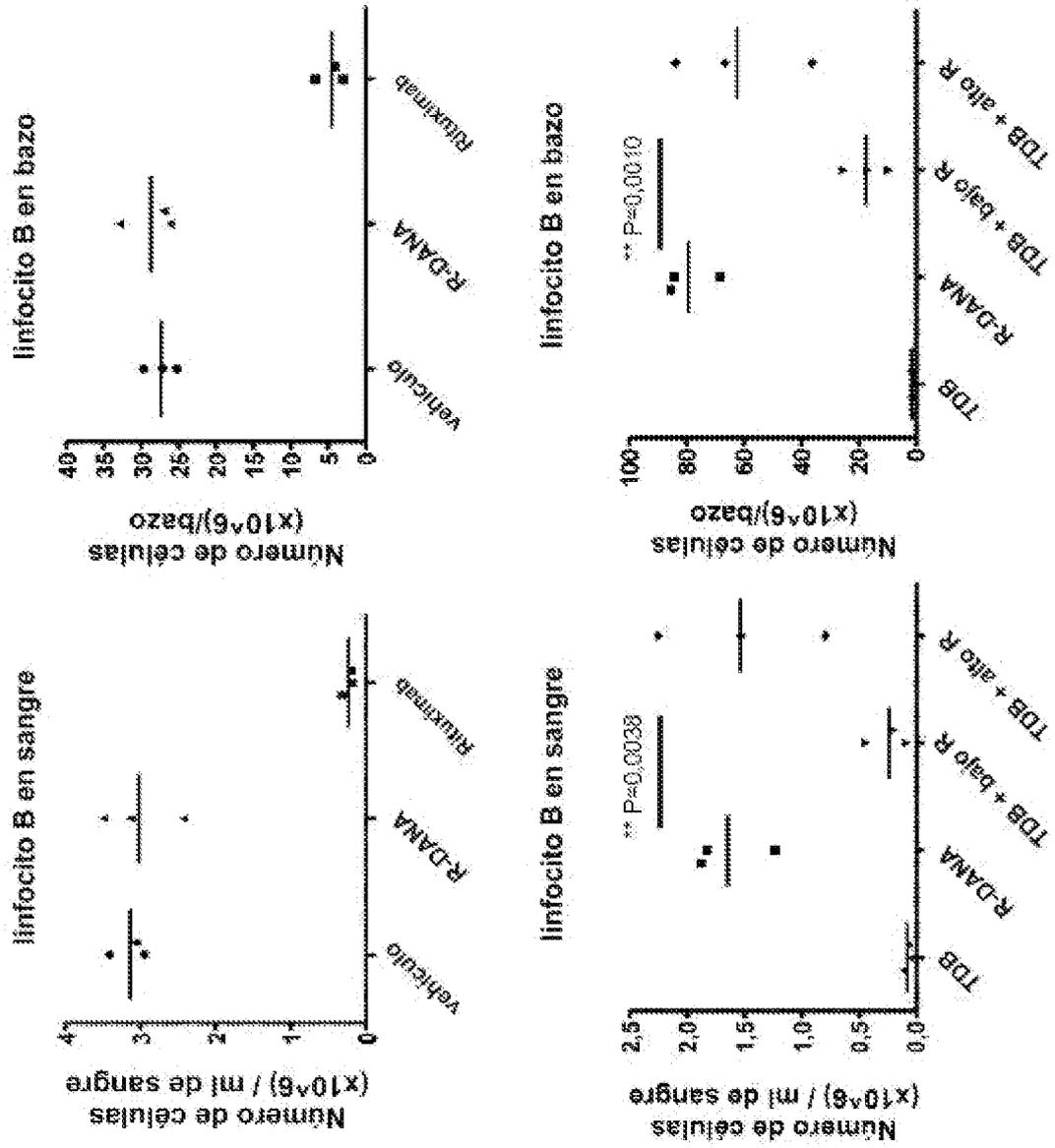


Figura 67A

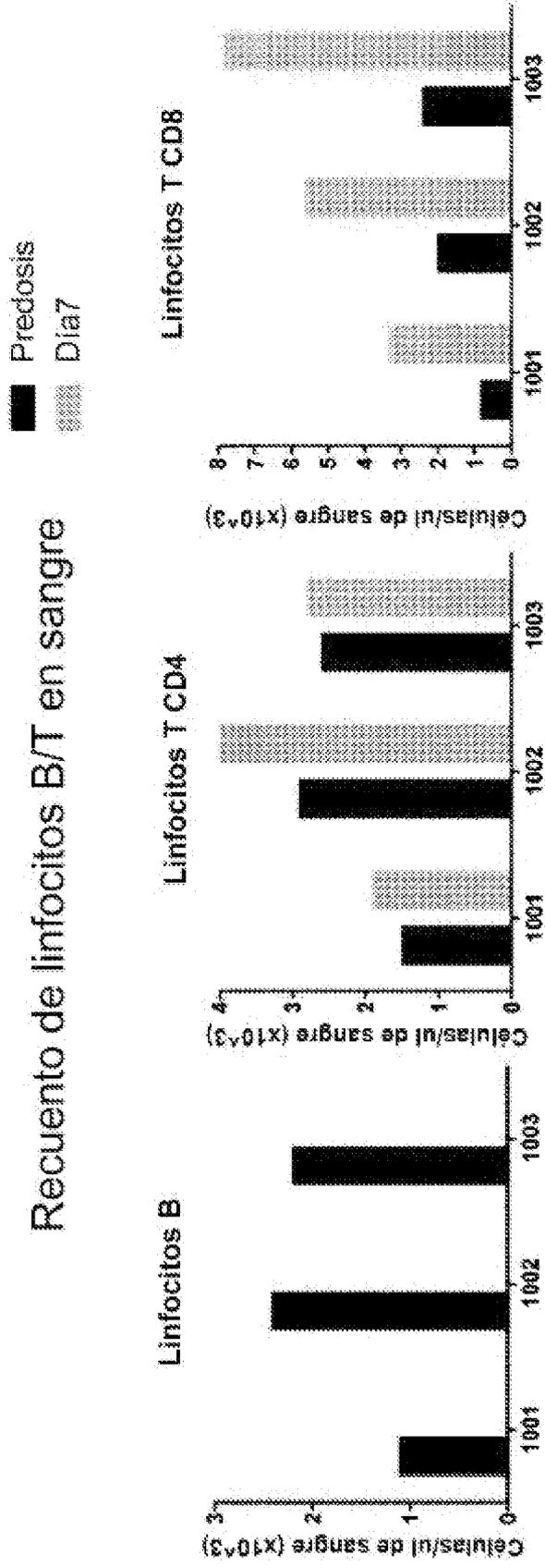


Figura 67B

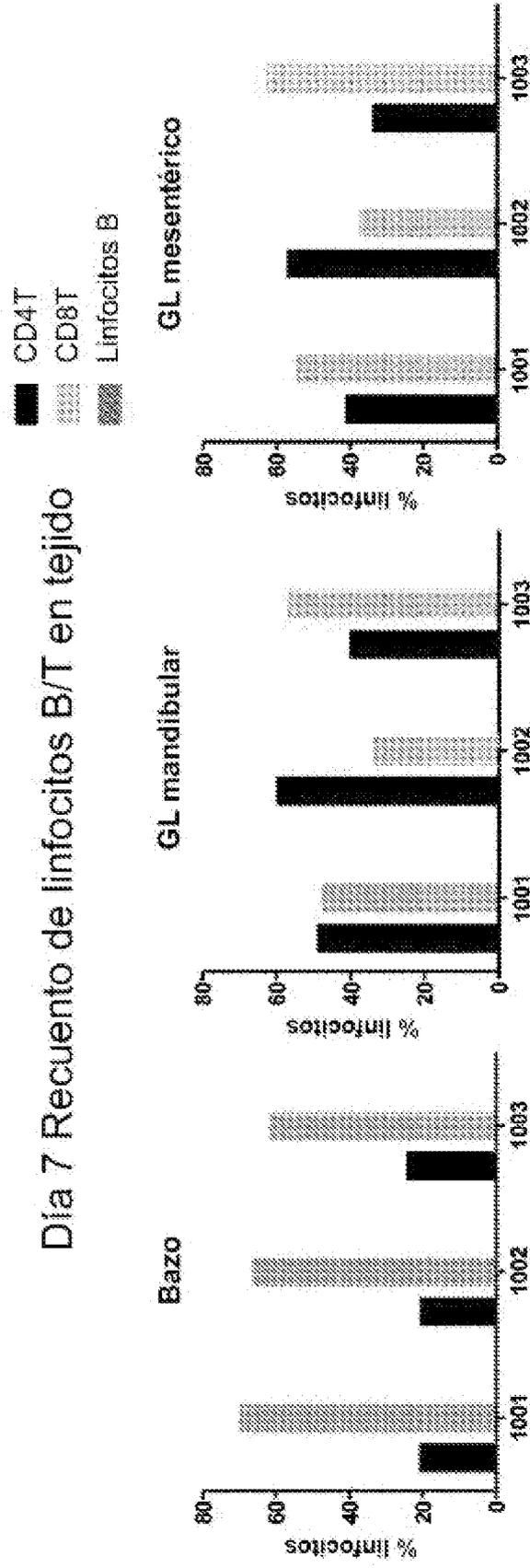


Figura 67C

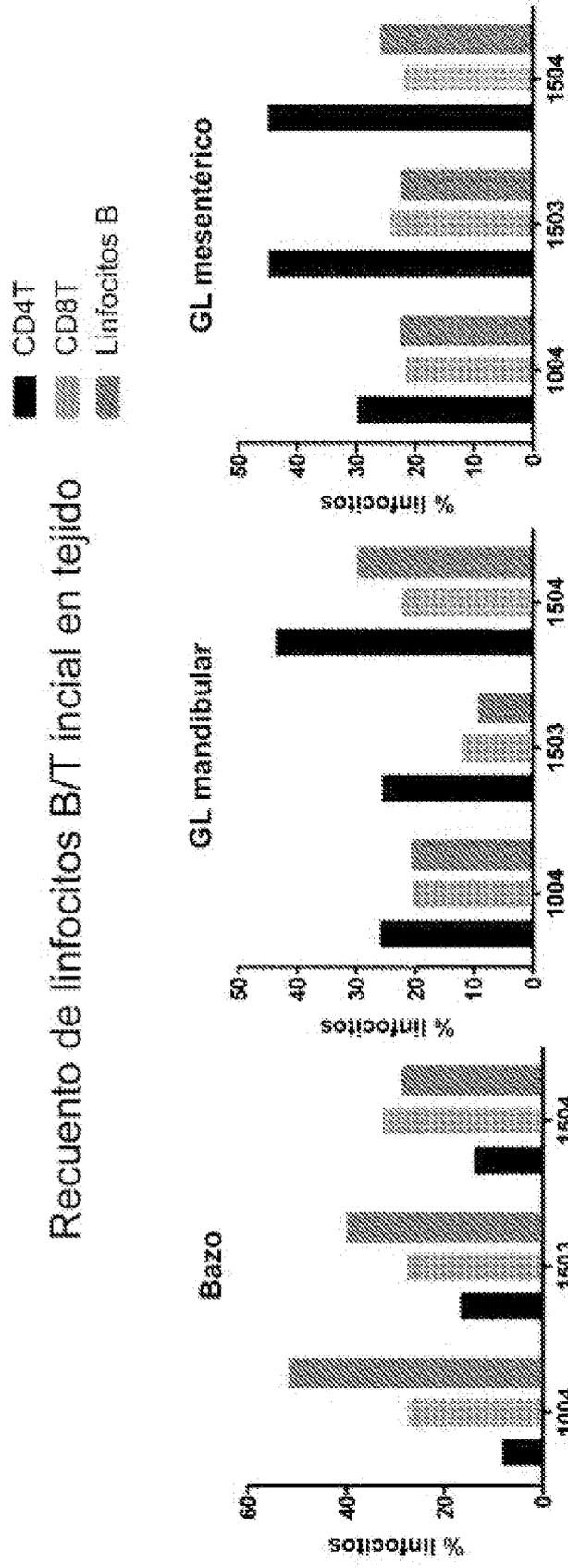


Figura 67D

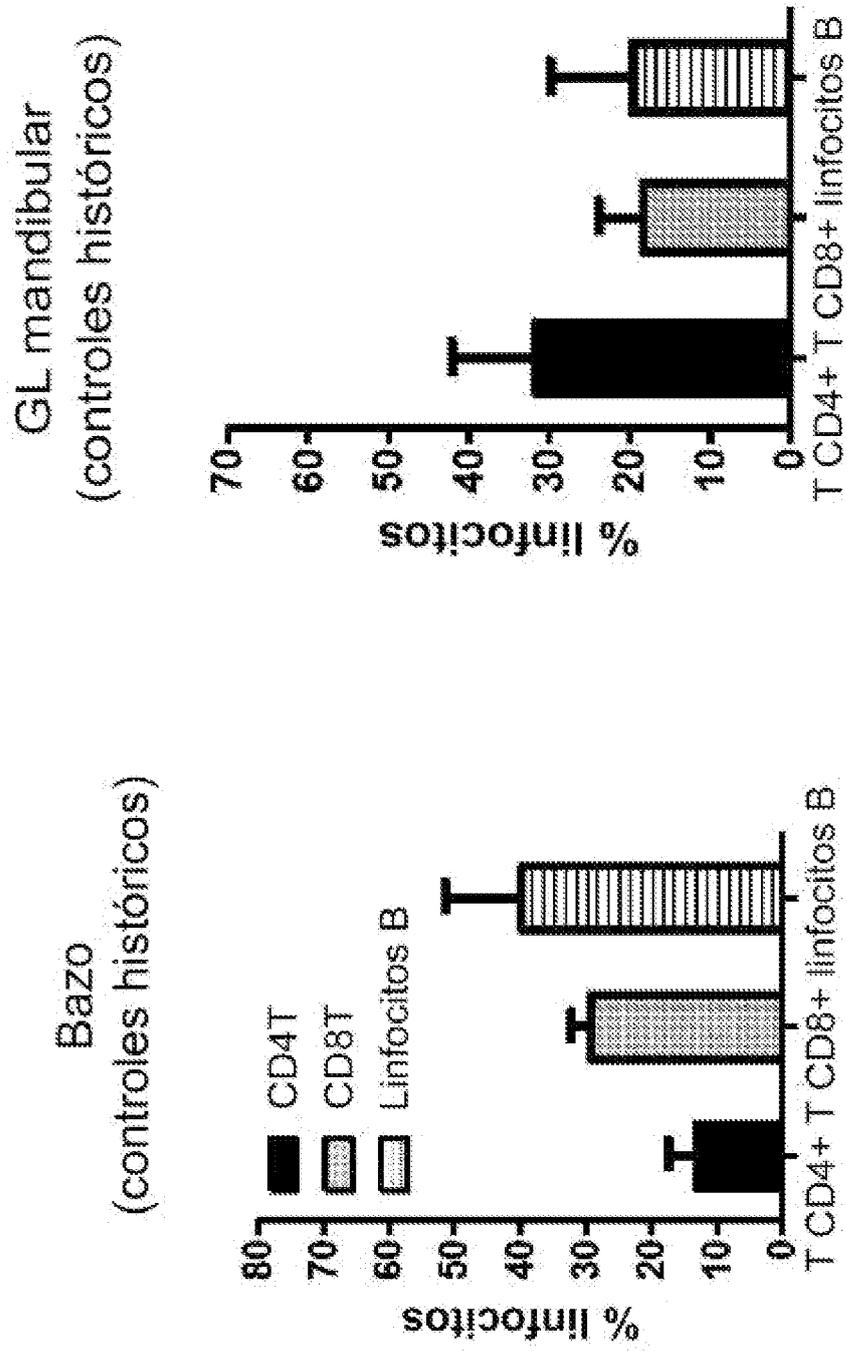


Figura 68A

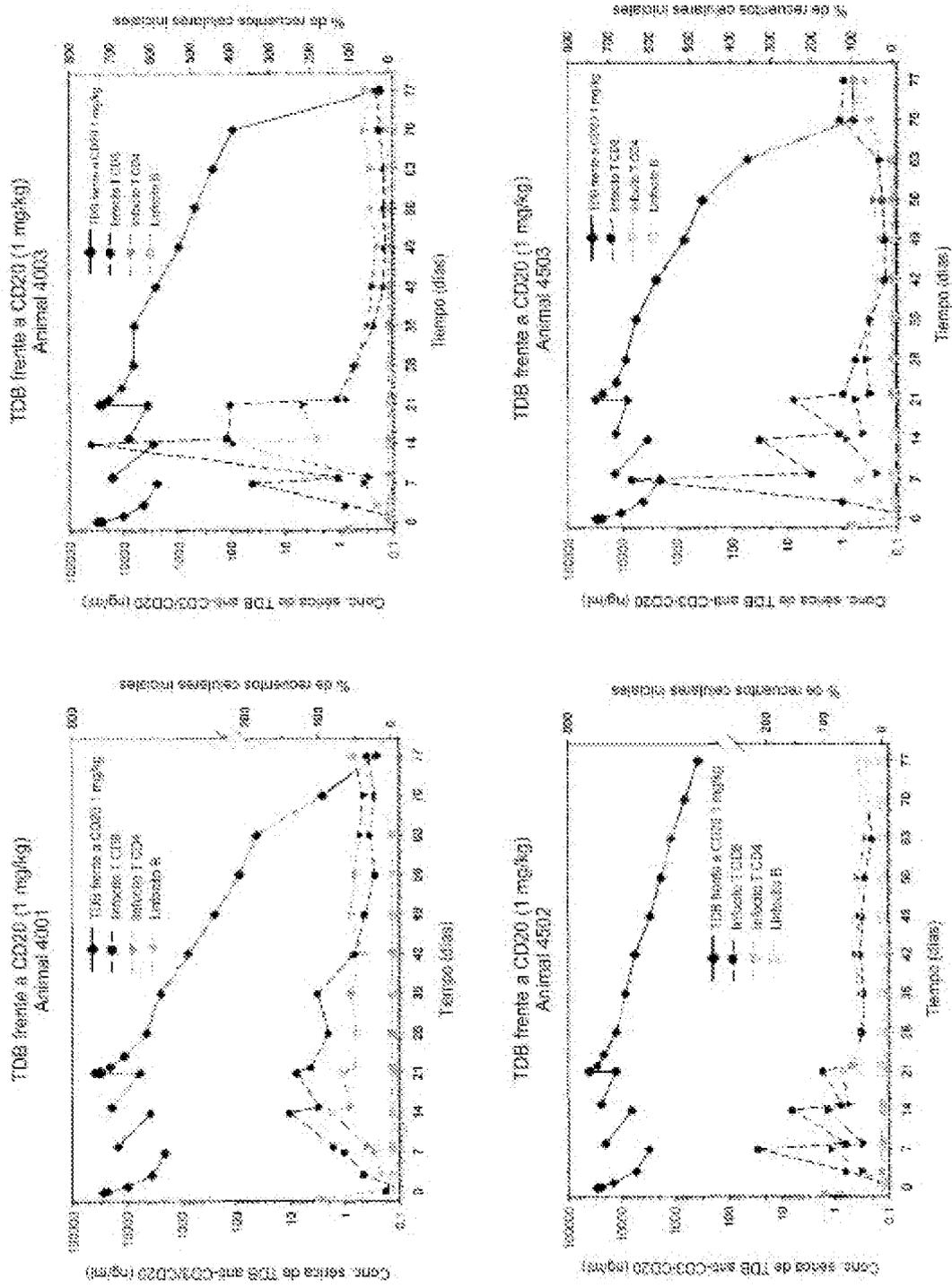
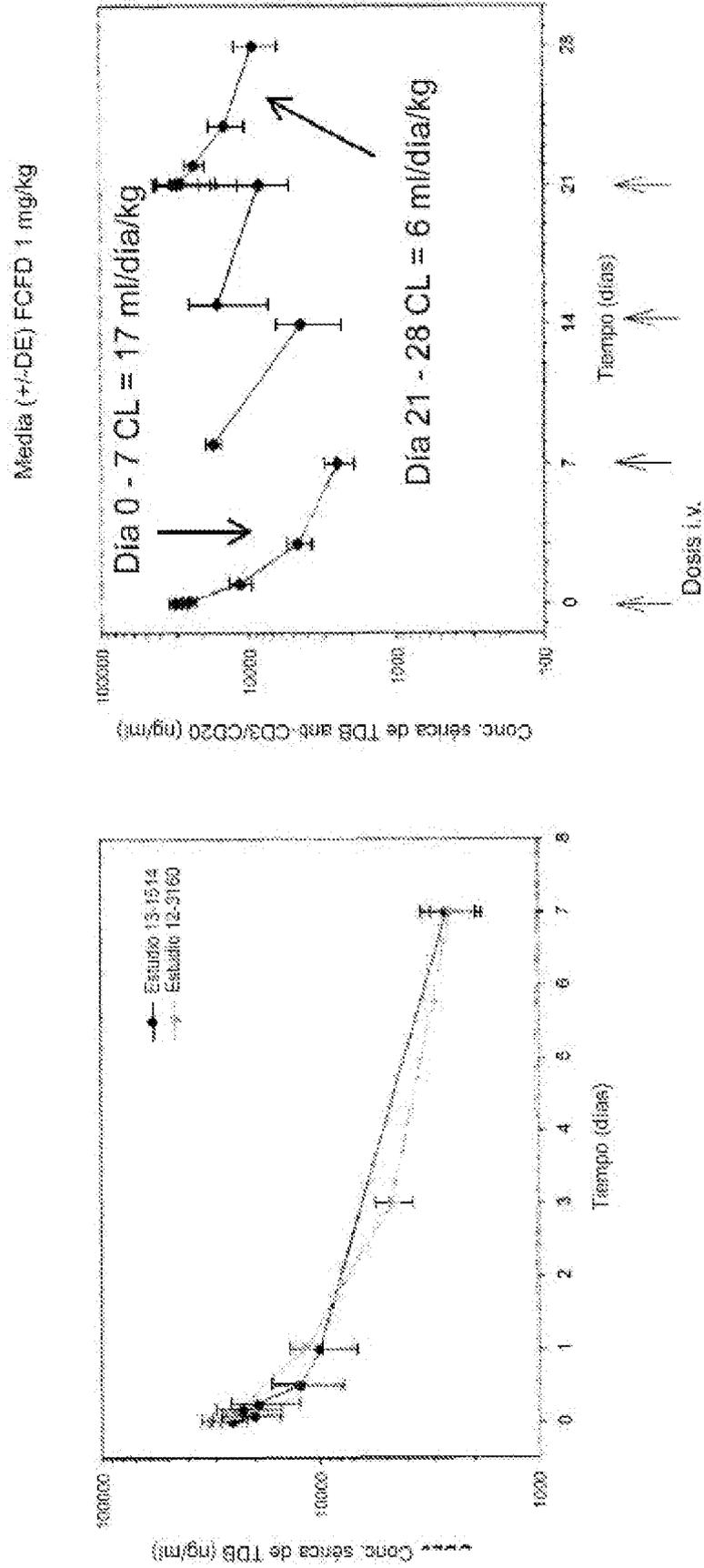


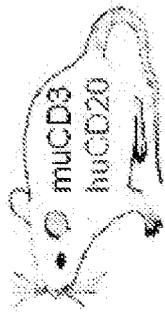
Figura 68B



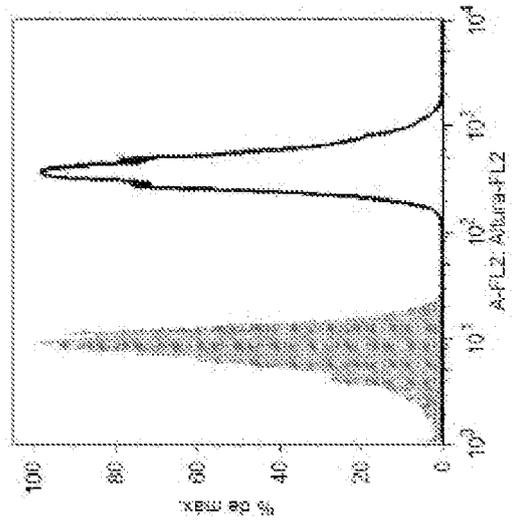
**Figuras 69A-69B**

**A20-huCD20 singénico en ratones Balb/C**

**A**



**Expresión de PD-L1 en células A20-huCD20**



**B**

vehículo  
 TDB frente a CD20 0.5 mg/kg  
 anti-PD-L1 10 mg/kg  
 TDB frente a CD20 + anti-PD-L1

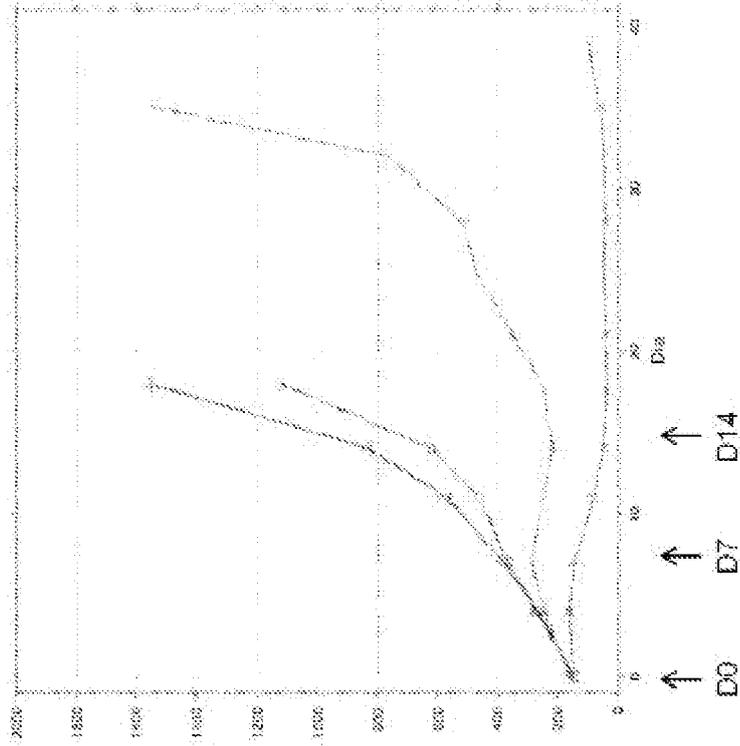
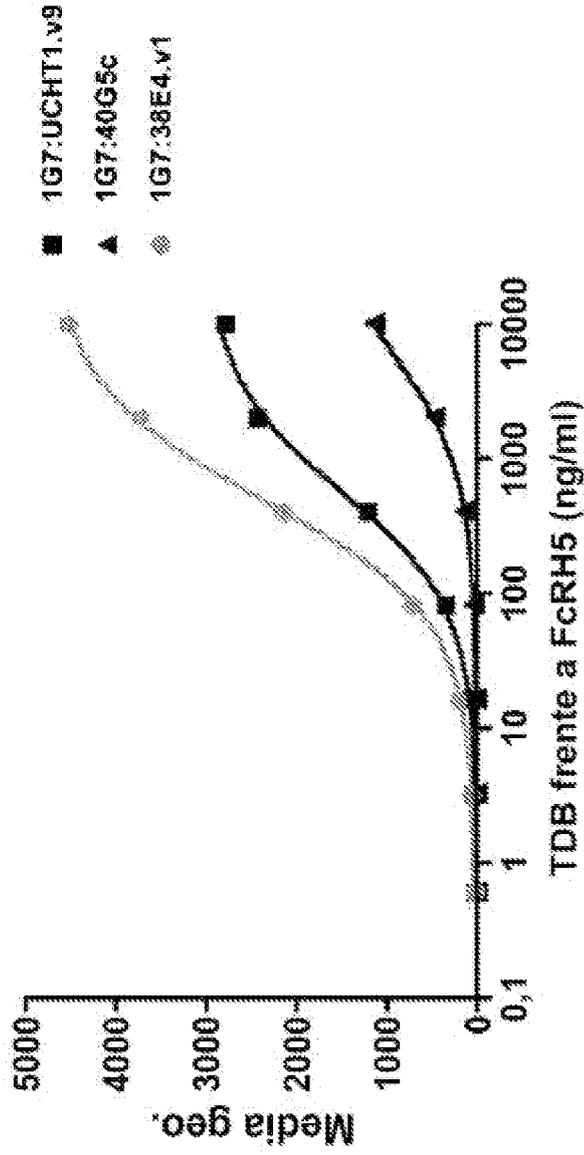


Figura 70

Unión a células CD8+



Unión:  
38E4.v1 > UCHT1.v9 > 40G5c

Figura 71A-71B

Destrucción de células diana (MOLP-2)

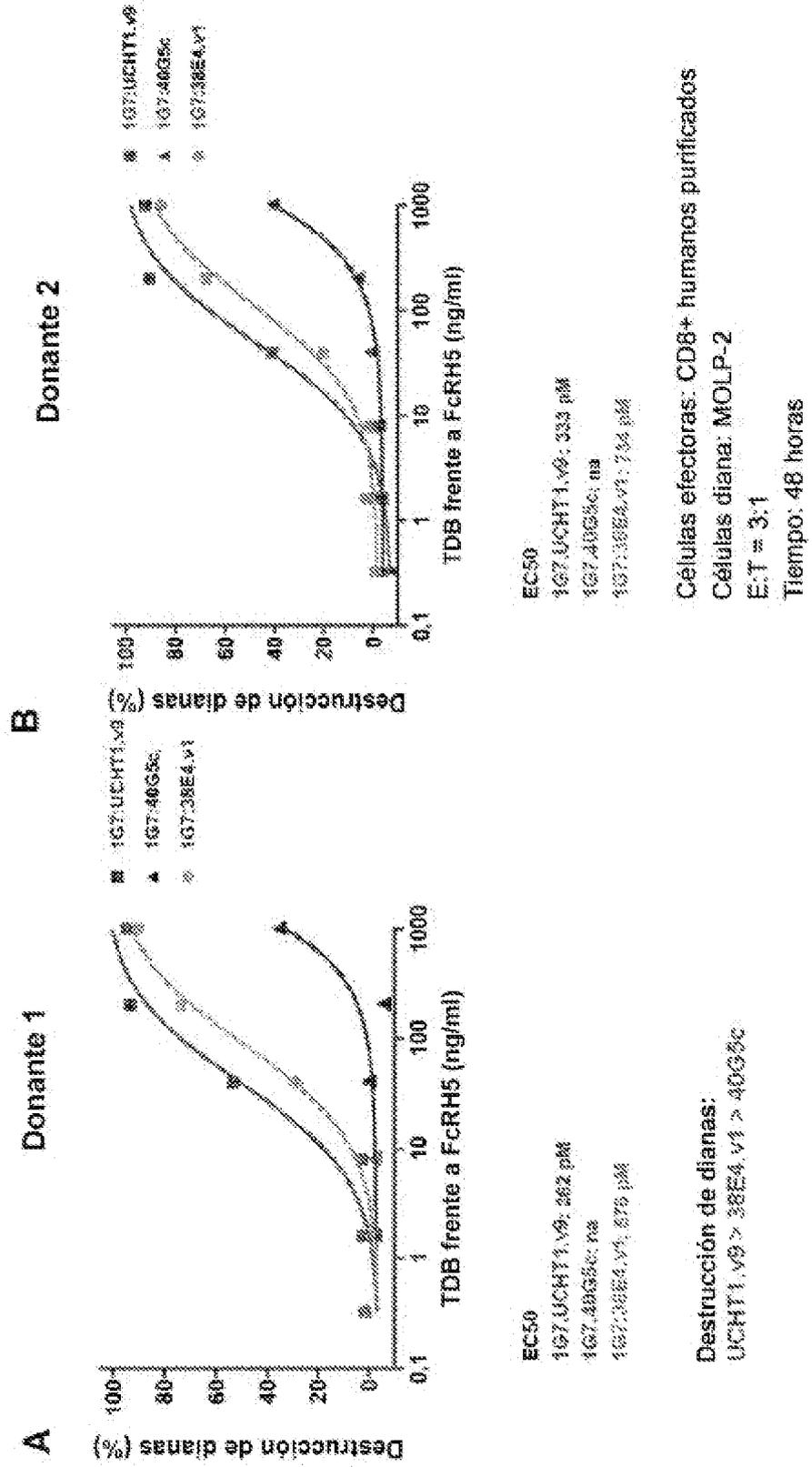
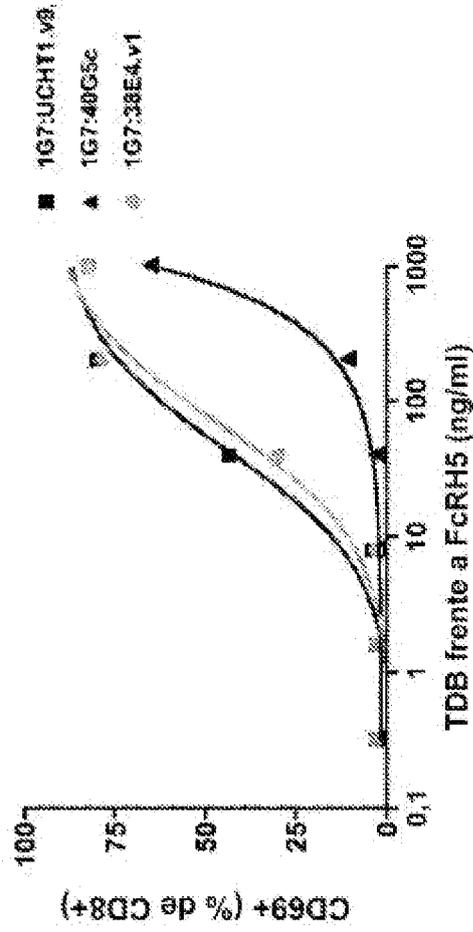


Figura 72A

### Activación de linfocitos T

Donante 1, CD69 (% de CD8+)



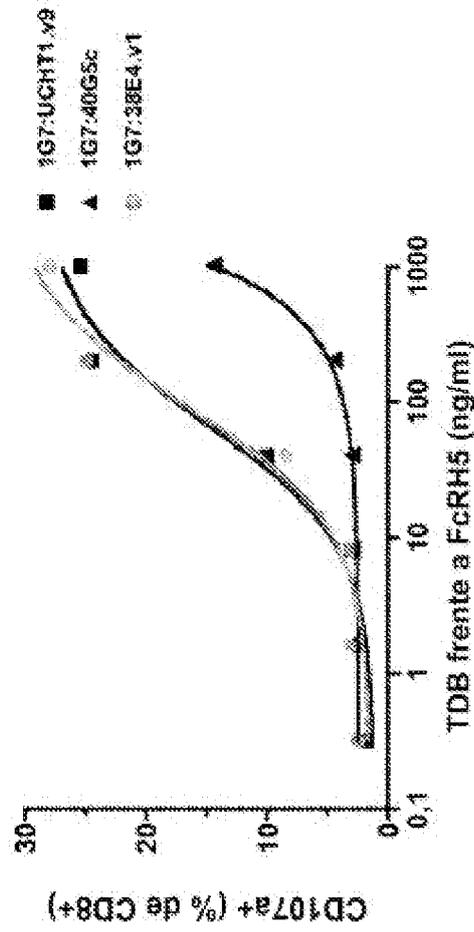
Activación de T:  
UCHT1.v9 >= 38E4.v1 > 40G5c

Células efectoras: CD8+ humanos purificados  
Células diana: MOLP-2  
E:T = 3:1  
Tiempo: 24 horas

Figura 72B

Activación de linfocitos T

Donante 1, CD107a (% de CD8+)



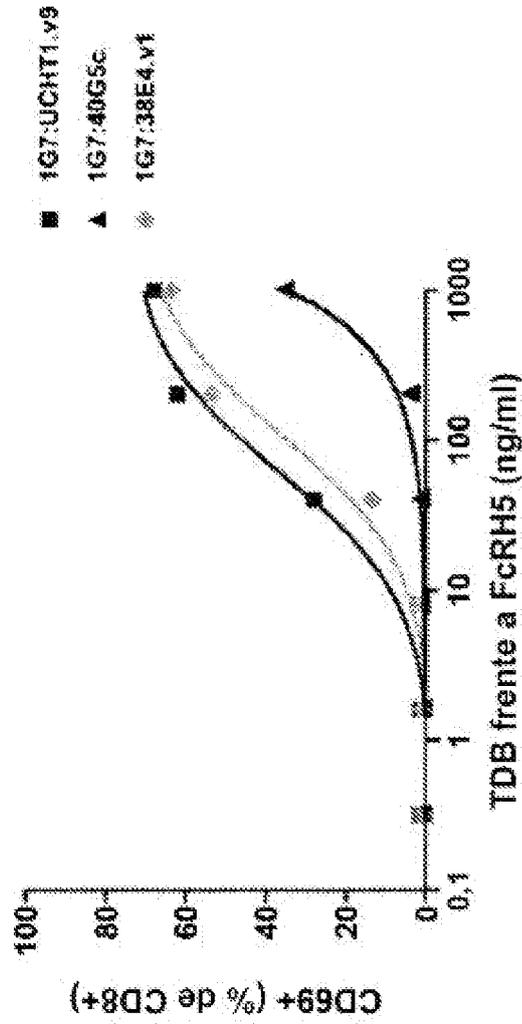
Activación de T:  
UCHT1.V9 ># 38E4.V1 > 40G5c

Células efectoras: CD8+ humanos purificados  
Células diana: MOLP-2  
E:T = 3:1  
Tiempo: 24 horas

Figura 72C

### Activación de linfocitos T

Donante 2, CD69 (% de CD8+)



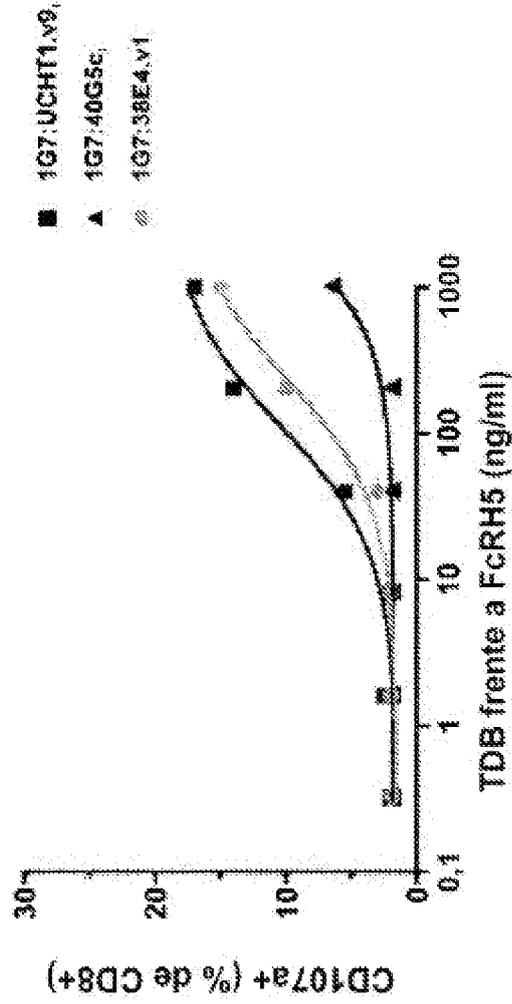
Células efectoras: CD8+ humanos purificados  
Células diana: MOLP-2  
E:T = 3:1  
Tiempo: 24 horas

Activación de T:  
UCHT1.v9 ># 38E4.v1 > 40G5c

Figura 72D

### Activación de linfocitos T

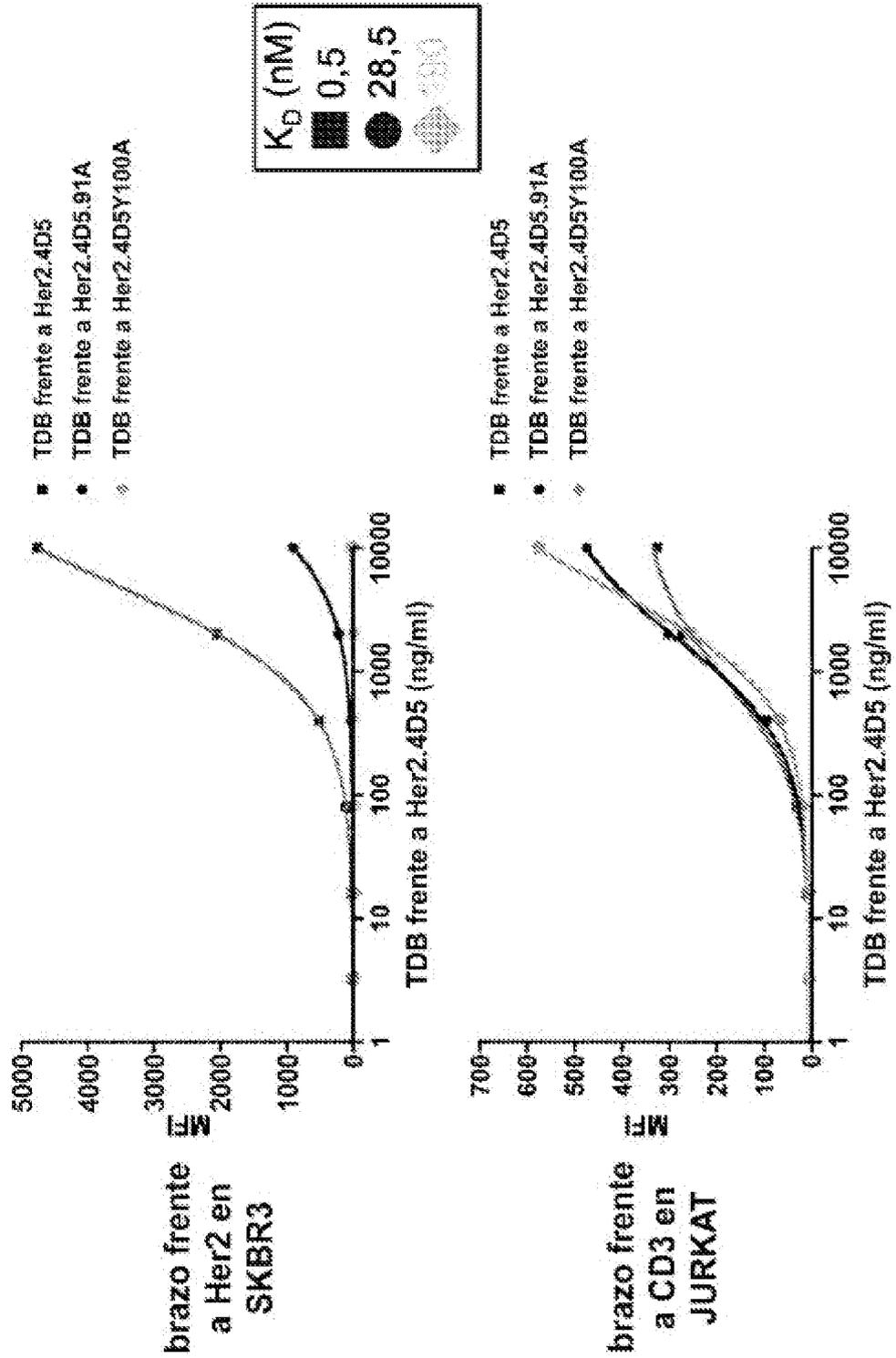
Donante 2, CD107a (% de CD8+)



Células efectoras: CD8+ humanos purificados  
Células diana: MOLP-2  
E:T = 3:1  
Tiempo: 24 horas

Activación de T:  
UCHT1.V9 > 38E4.V1 > 40G5c

Figura 73



**Figuras 74A-74C**

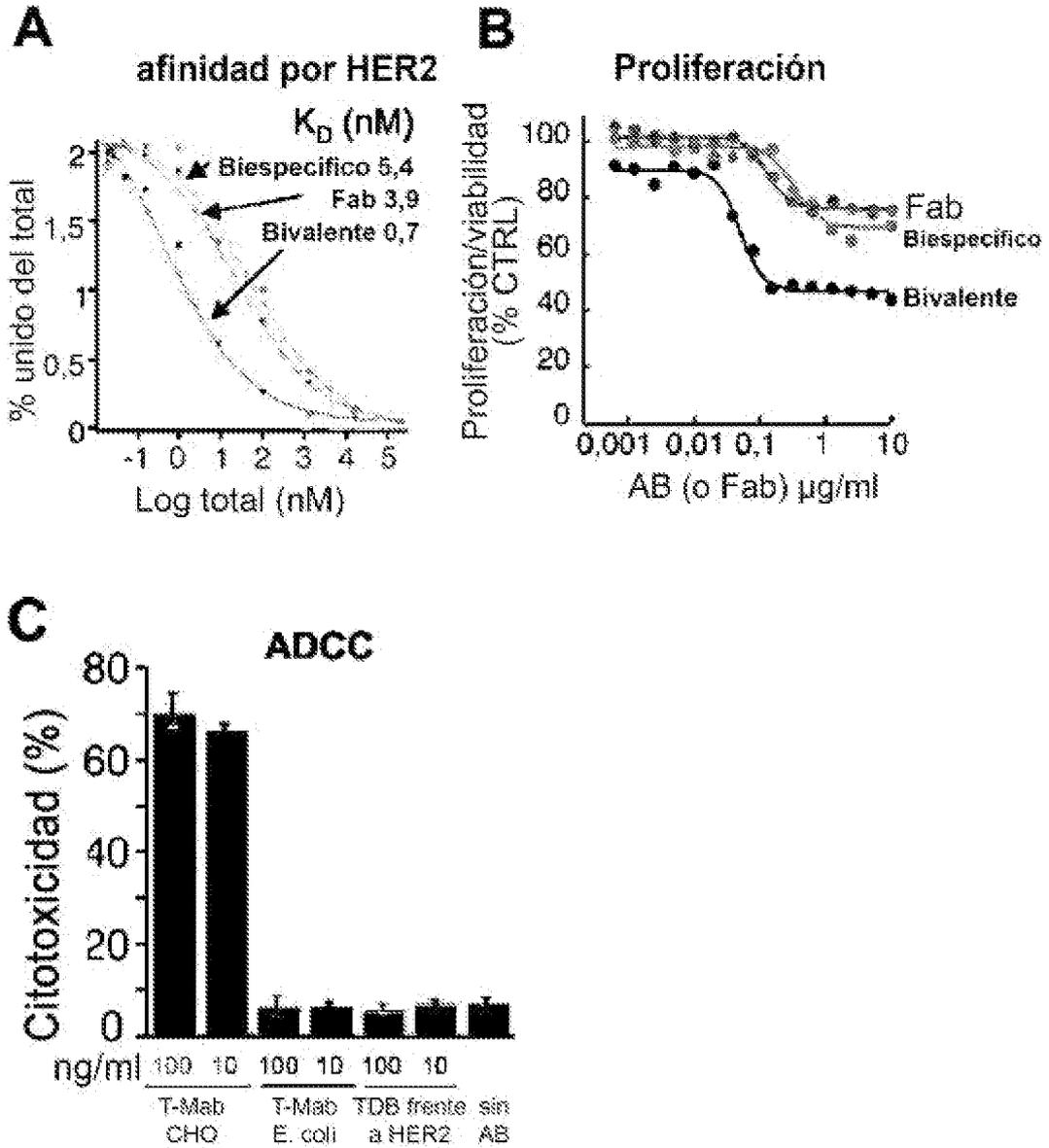
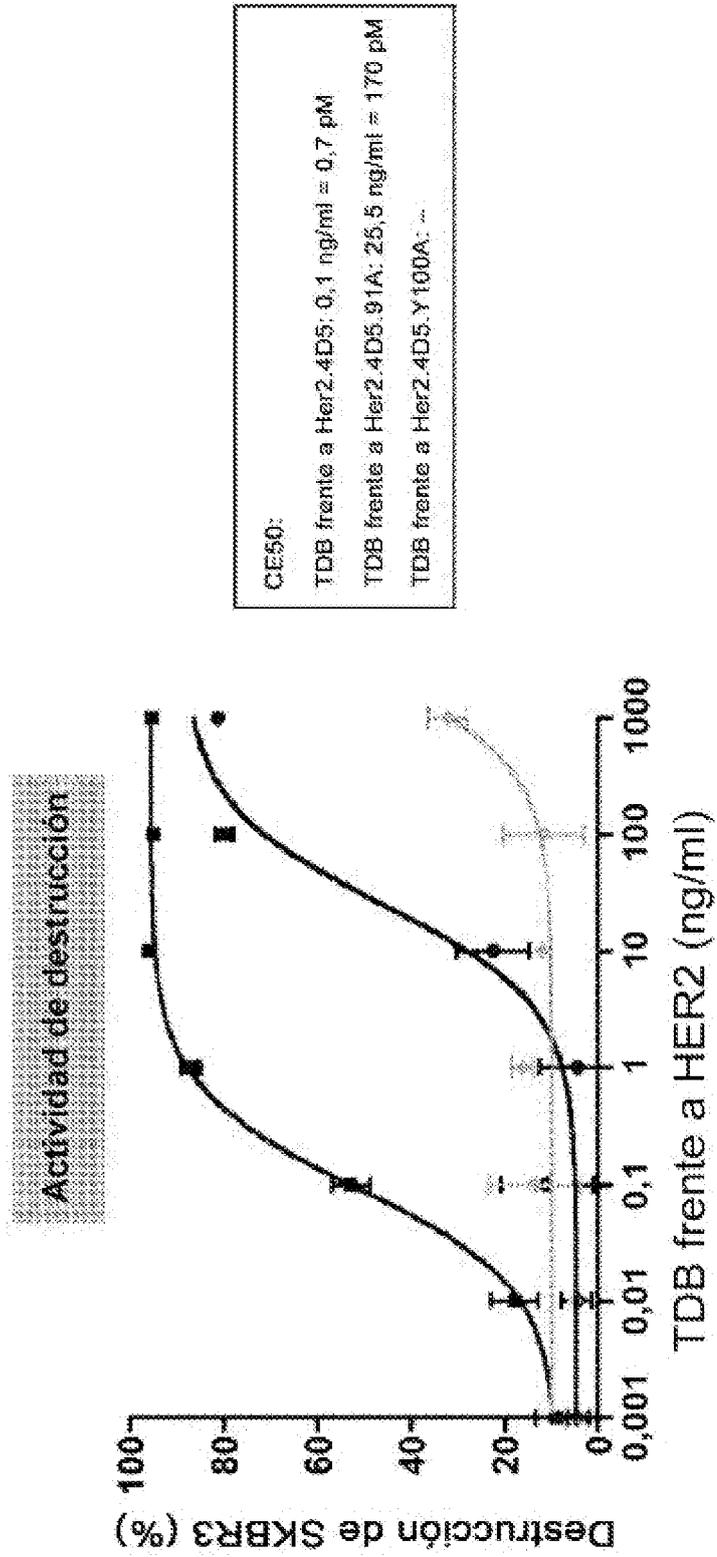
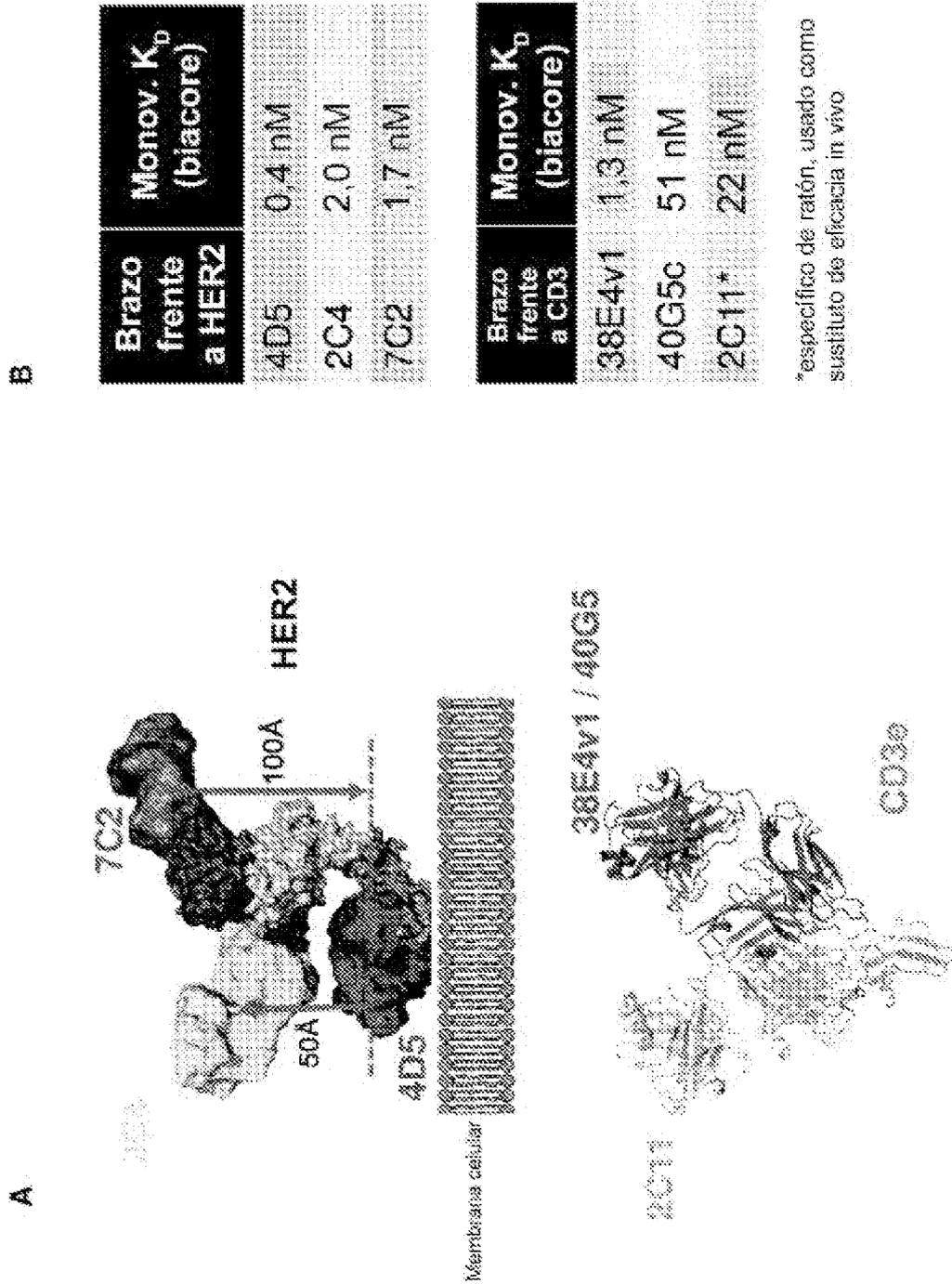


Figura 75



**Figuras 76A-76B**



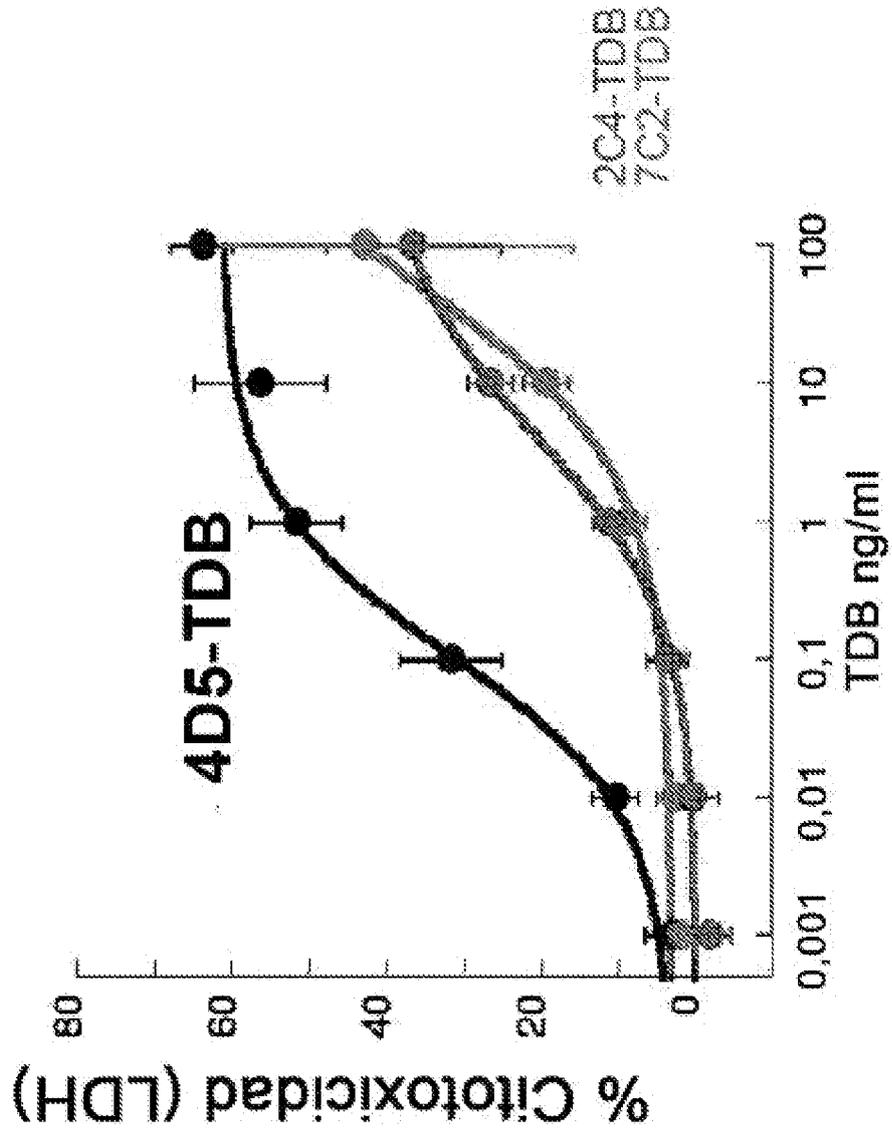


Figura 76C

Figura 77

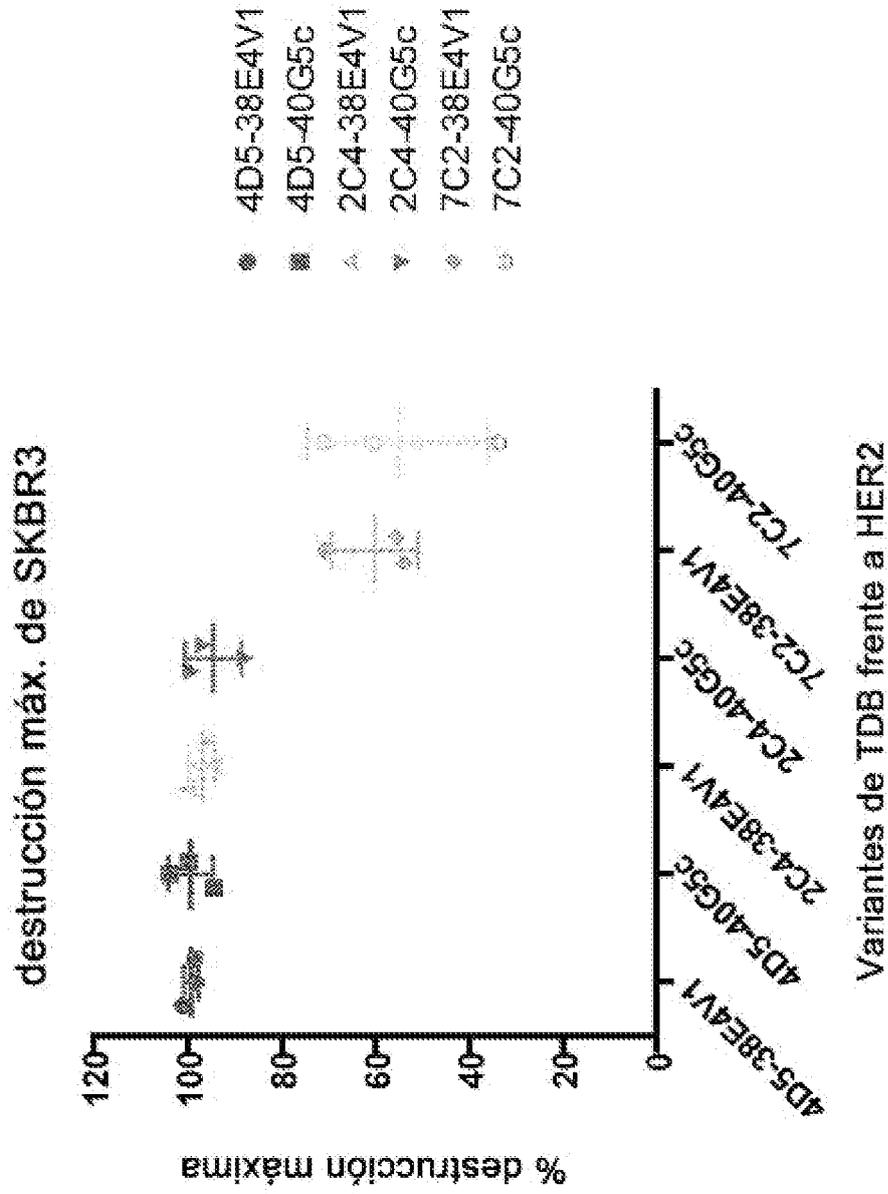




Figura 79

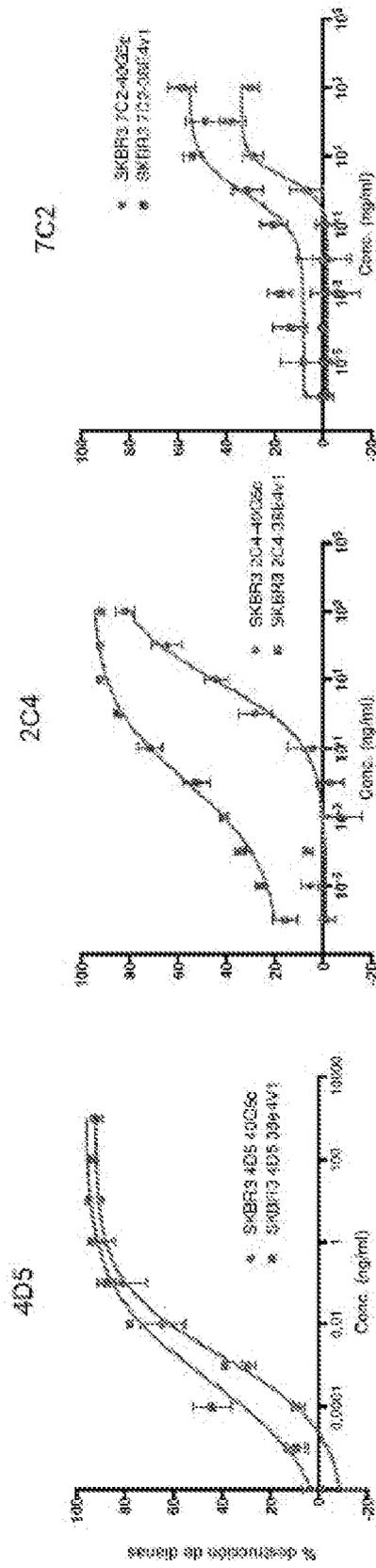
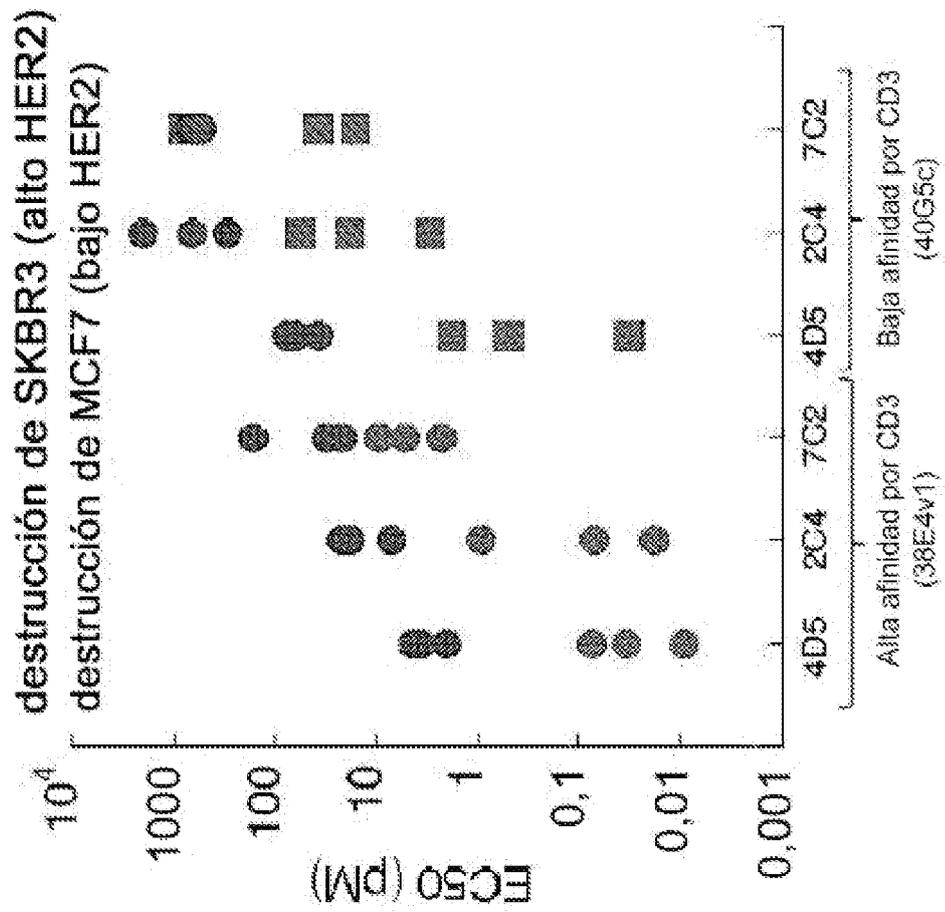


Figura 80



EC<sub>50</sub> MCF7 / EC<sub>50</sub> SKBR3

HER2	xCD3	Expt1	Expt2	Expt3
4D5	38E4v1	46	225	128
2C4	38E4v1	406	311	20
7C2	38E4v1	10	6	17
4D5	40G5c	1154	126	42
2C4	40G5c	100	11	110
7C2	40G5c	26	42	0

Figura 81

Variante	CE50 de SKBR3 ng/ml	KD de HER2 (nM)	KD en veces	CE50 en veces de SKBR3
4D5-40G5c	0,007577	0,5	1	1
hu4D5.v7	0,8575	2,7	5,4	113
hu4D5.v5	75,01	15,6	31,2	9900
hu4D5.v10	127,4	9,4	18,8	16814
hu4D5.v31	3202	16	32,0	422595
hu4D5.Y100A	>10K	60	120,0	

Diferencia en veces frente a WT 4D5

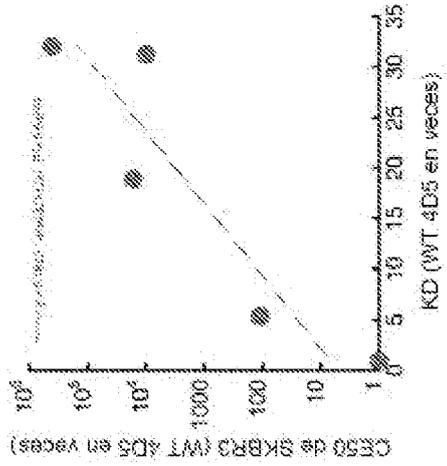


Figura 82

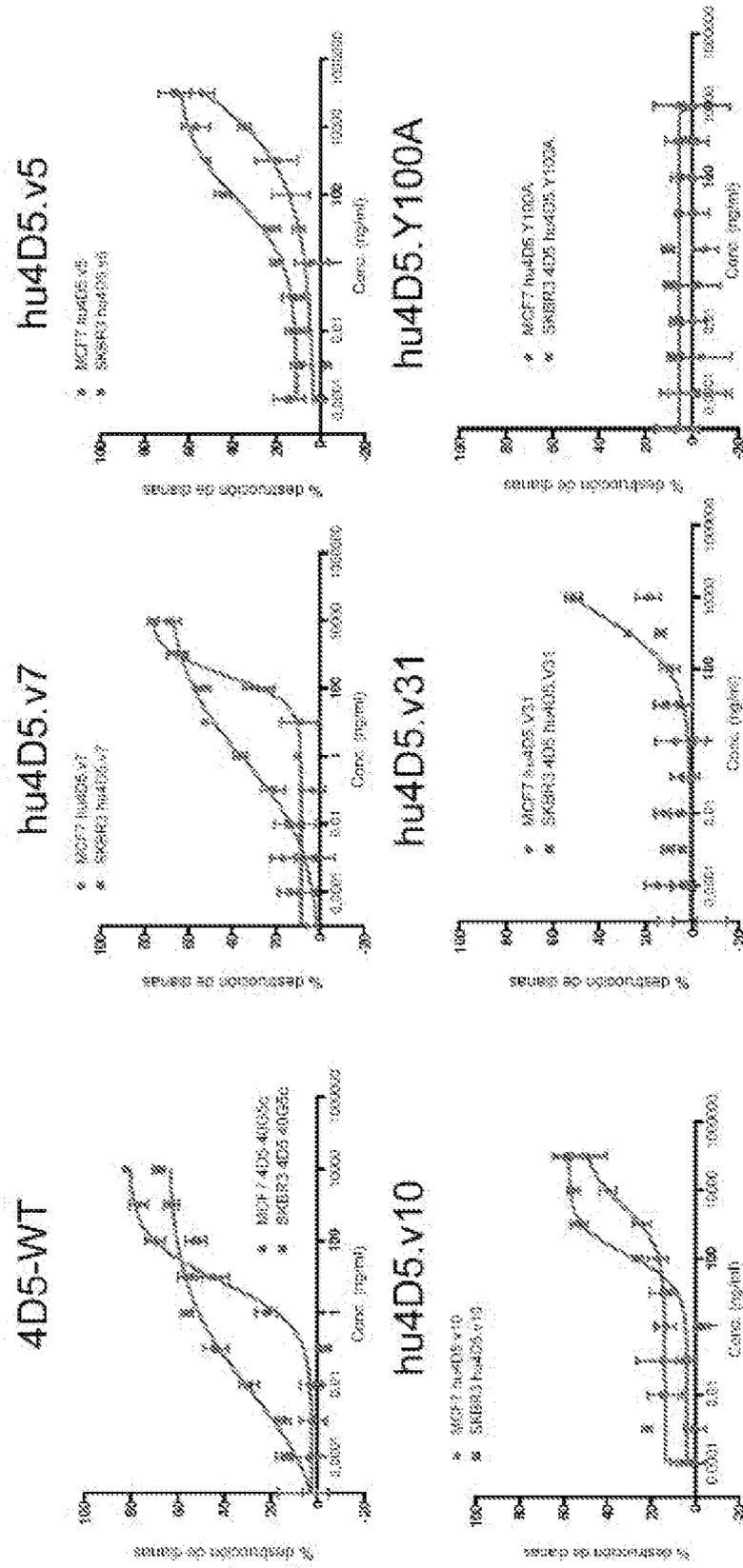


Figura 83

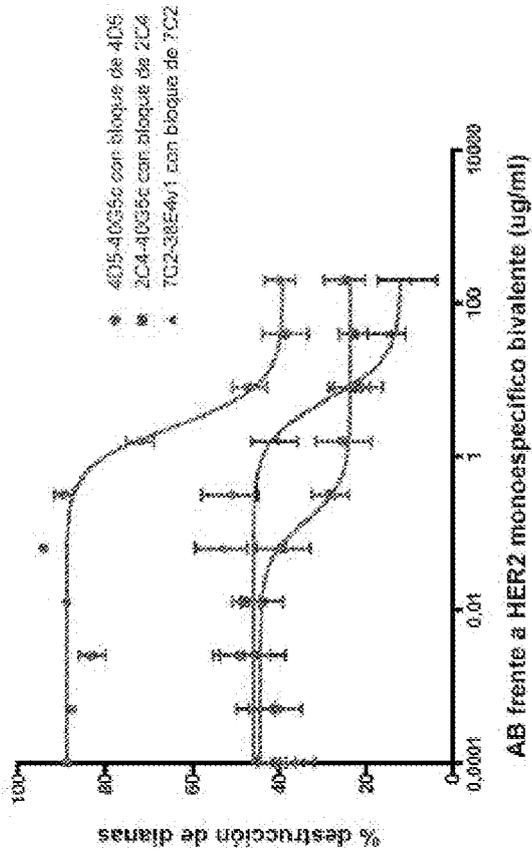
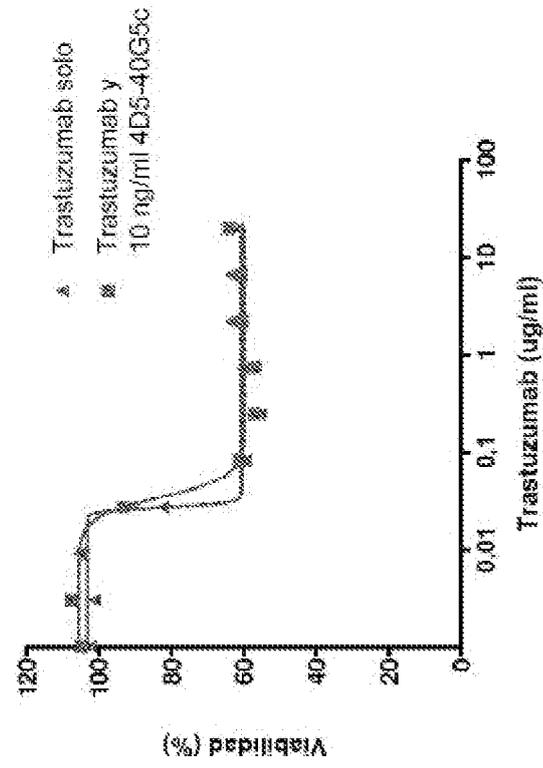


Figura 84

clon	ELISA	ip*	FACS*	Dominio	Epítipo**	Sometido a prueba comobies-pecífico	Bloqueado por 4D5	Nota
2C4	+++	++	+++	2	22-584	Y	N	Actividad media
2H11	+	++	++	4	529-645	Y	Y	Baja actividad
3E8	+	+++	+++	4	512-625	N	Y	
3H4	+	+	+	4	541-599	Y	Y	Alta actividad
4D5	++	++	+++	4	561-625	Y	Y	Alta actividad
5B6	+	++	+	?		Y	N	Baja actividad
6E9	++	+	neg	?		N		FACS neg.
7C2	++	++	+++	1	22-53	Y	N	Baja actividad
7F3	+++	+++	+++	1	22-53	N	N	Dominio 1

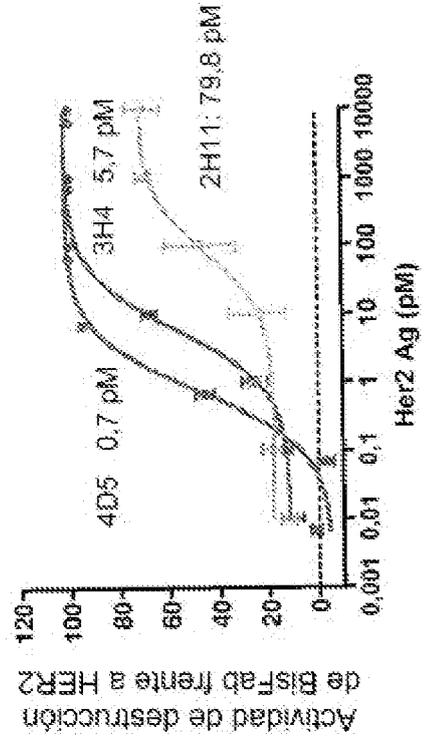
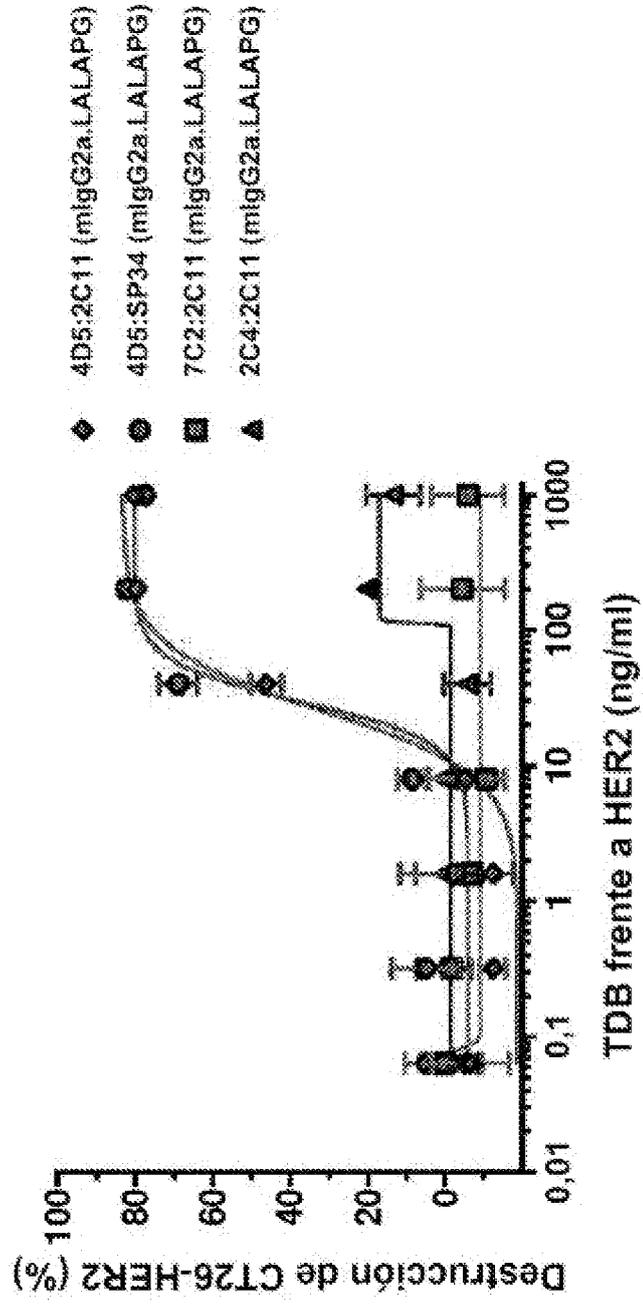


Figura 85

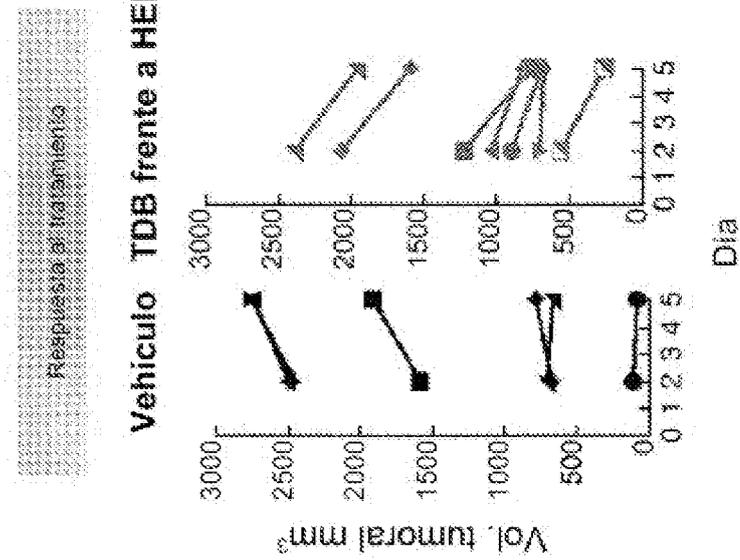
Brazo frente a CD3	Monov. $K_D$ (nM, biacore)	Reactividad
38E4v1 humanizado	1,3	hu, macaco cangrejero
38E4 murino	0,75	hu, macaco cangrejero
SP34 murino	1,9	hu, macaco cangrejero
40G5c humanizado	51	hu, macaco cangrejero
2C11	22	ratón

Figura 86

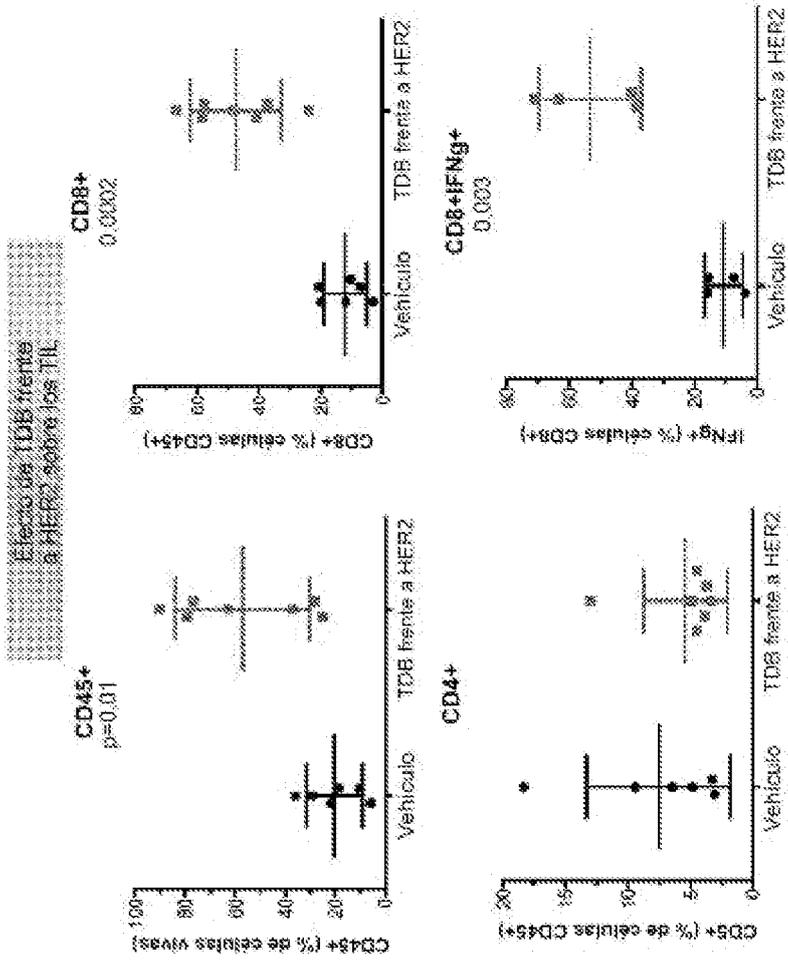


**Figuras 87A-87B**

**A**



**B**



**Figuras 88A-88B**

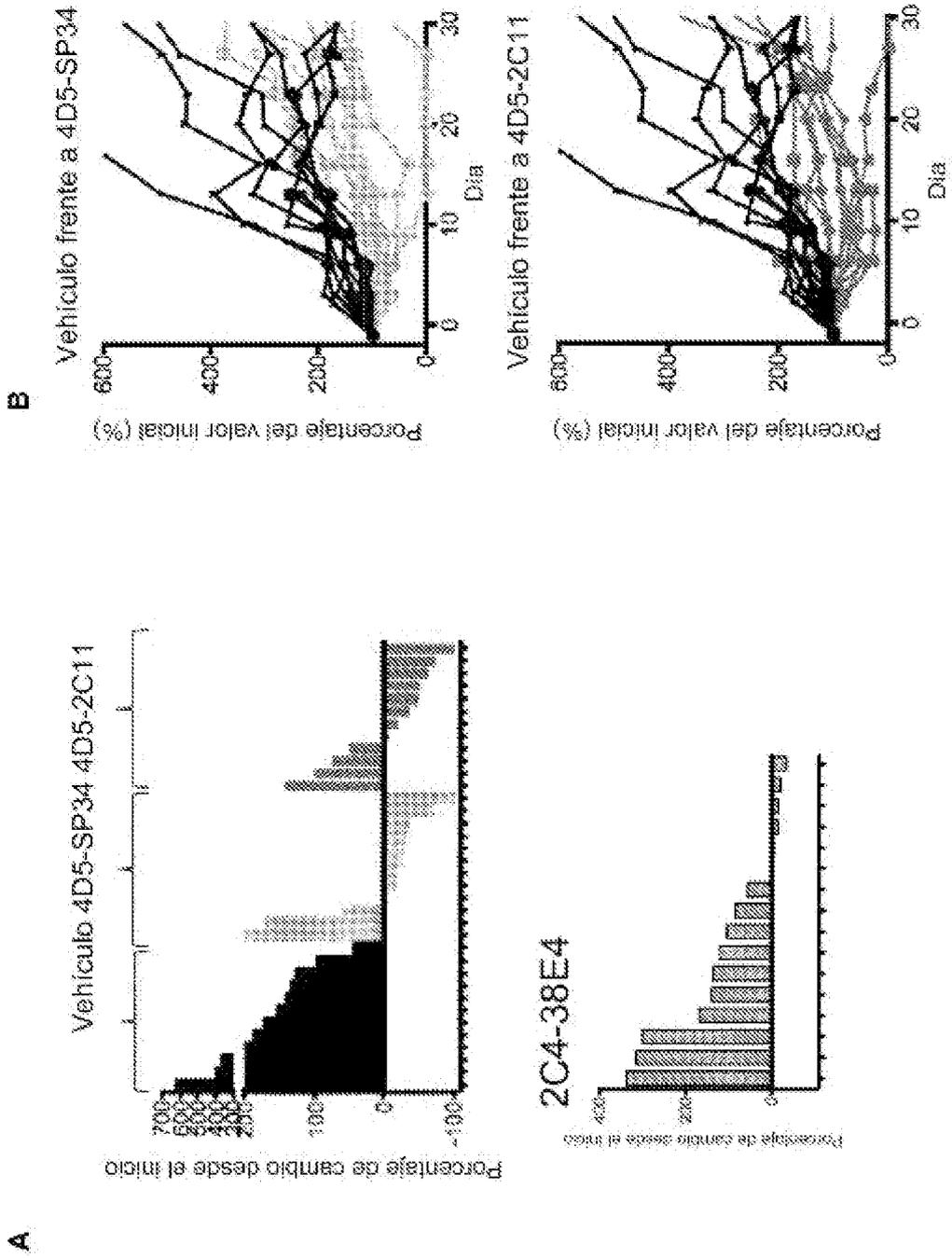
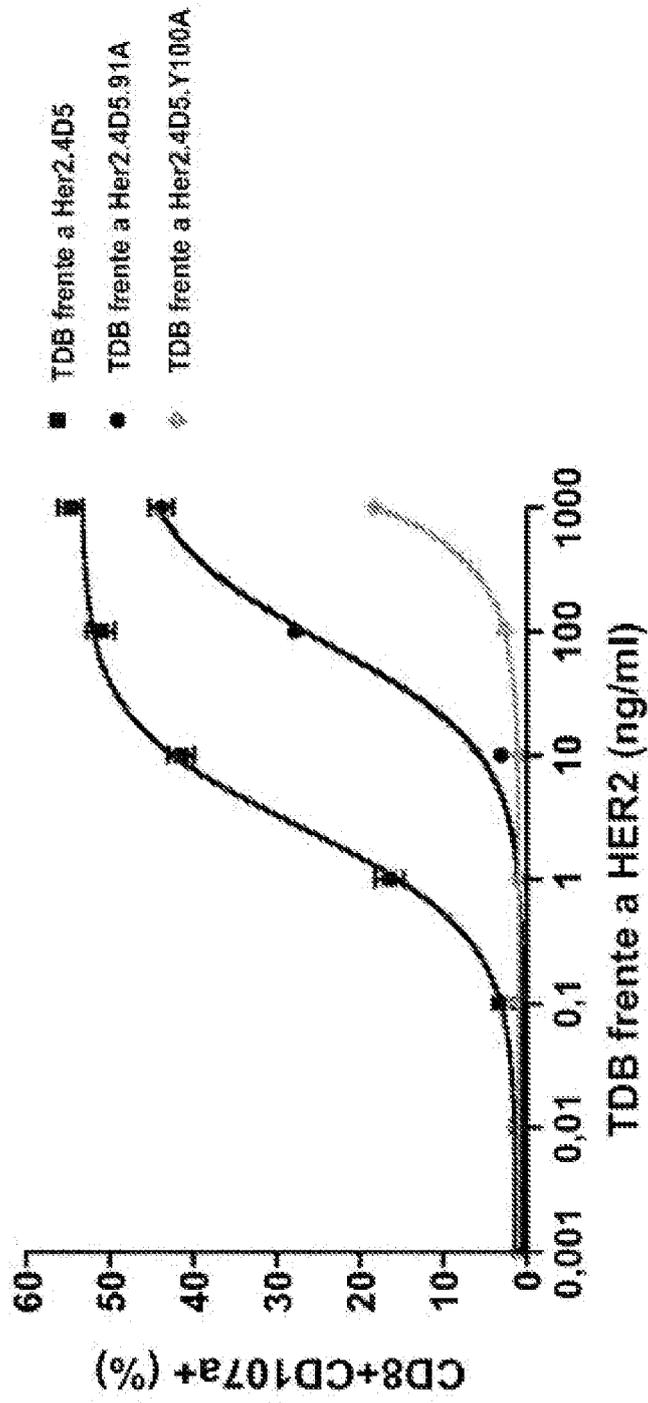


Figura 89



Células efectoras: Linfocitos T CD8+

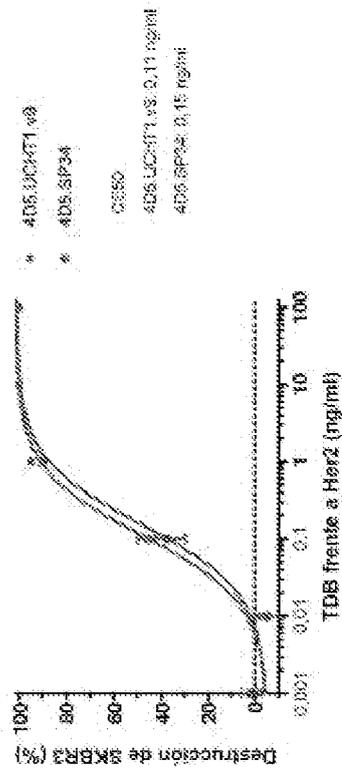
Células diana: SKBR3

proporción E:T = 3:1

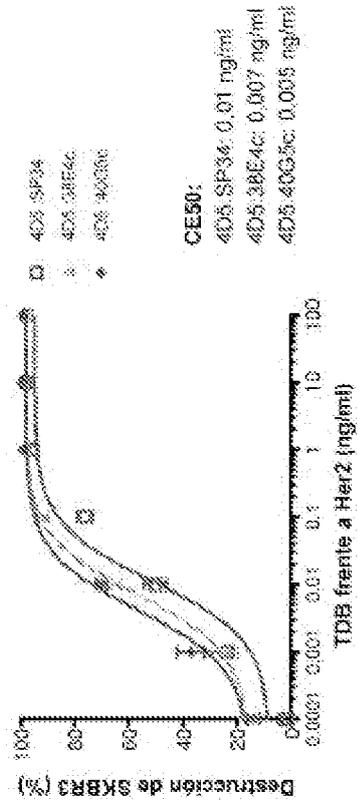
Tiempo: 24 horas

**Figuras 90A-90C**

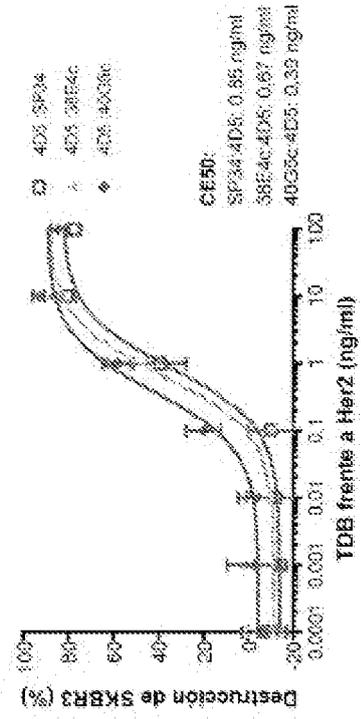
**A** UCHT1 vs. SP34



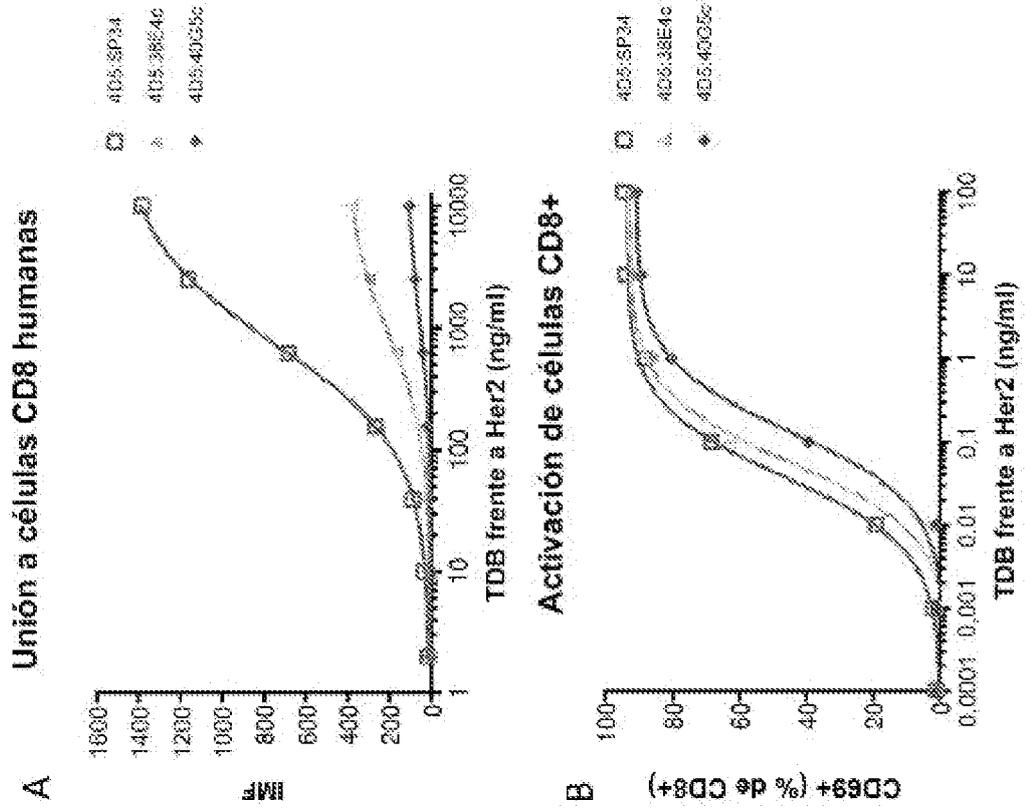
**B** SP34 frente a 38E4c. frente a 40G5c



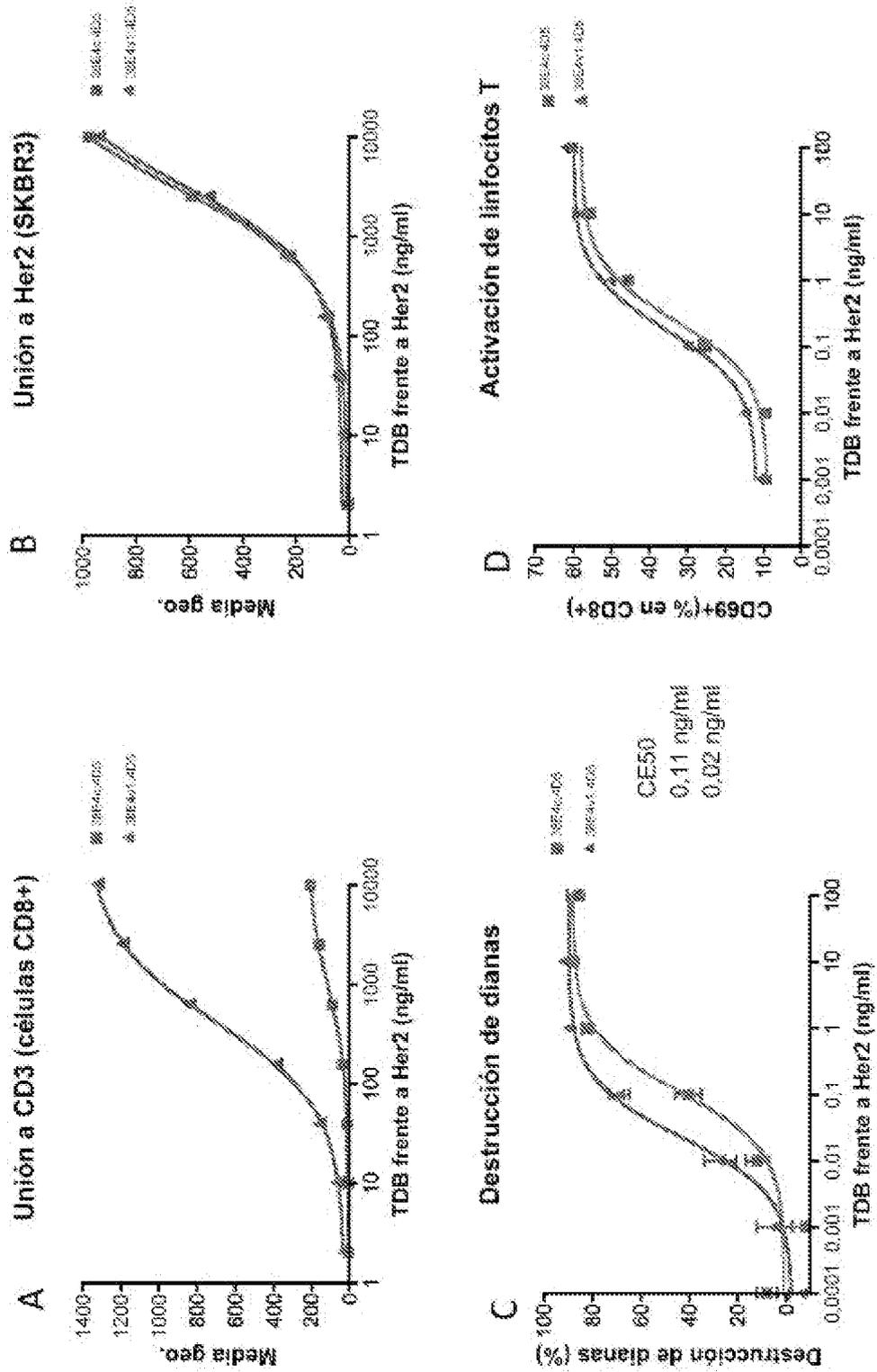
**C** SP34 frente a 38E4c. frente a 40G5c



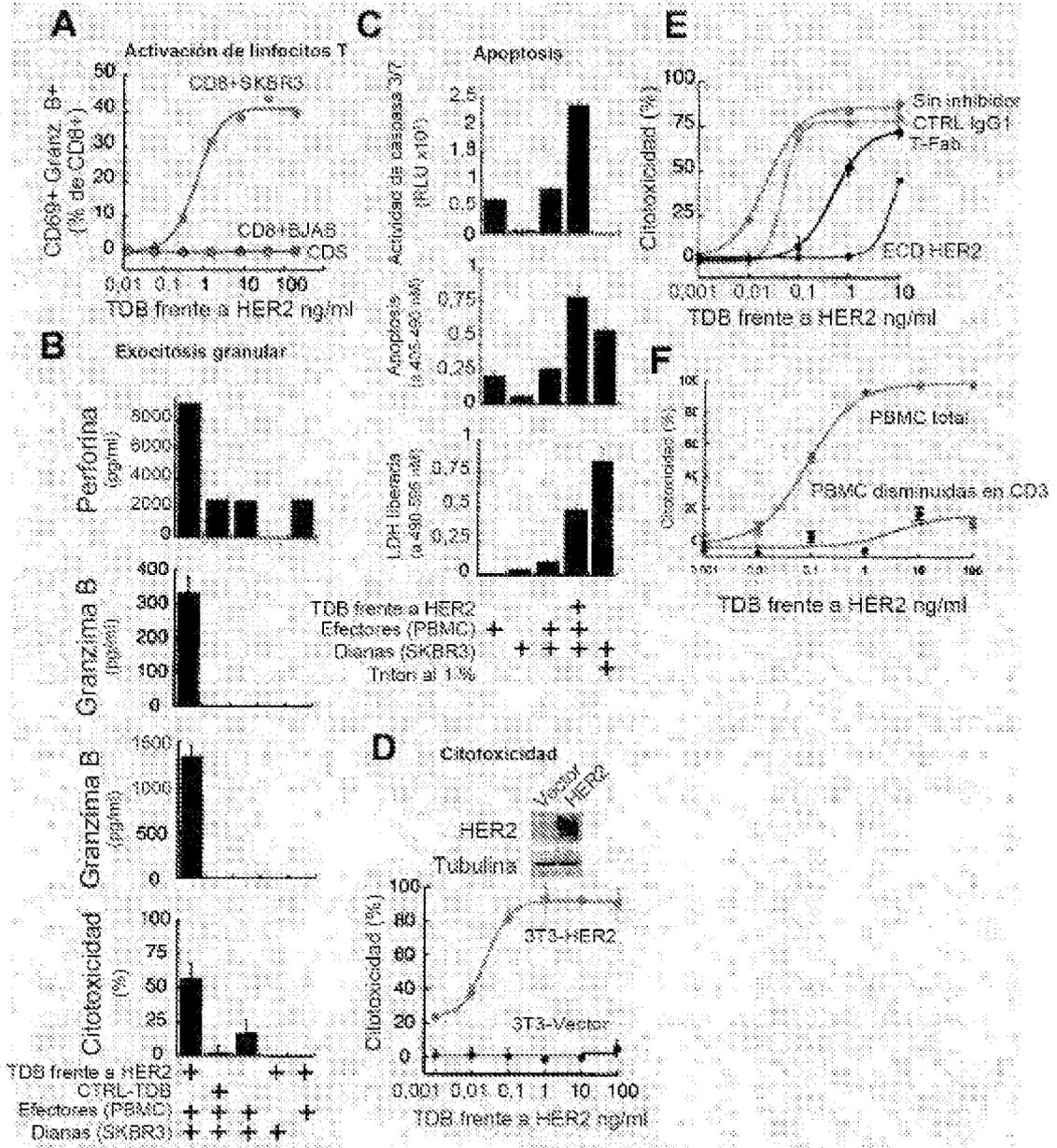
Figuras 91A-91B



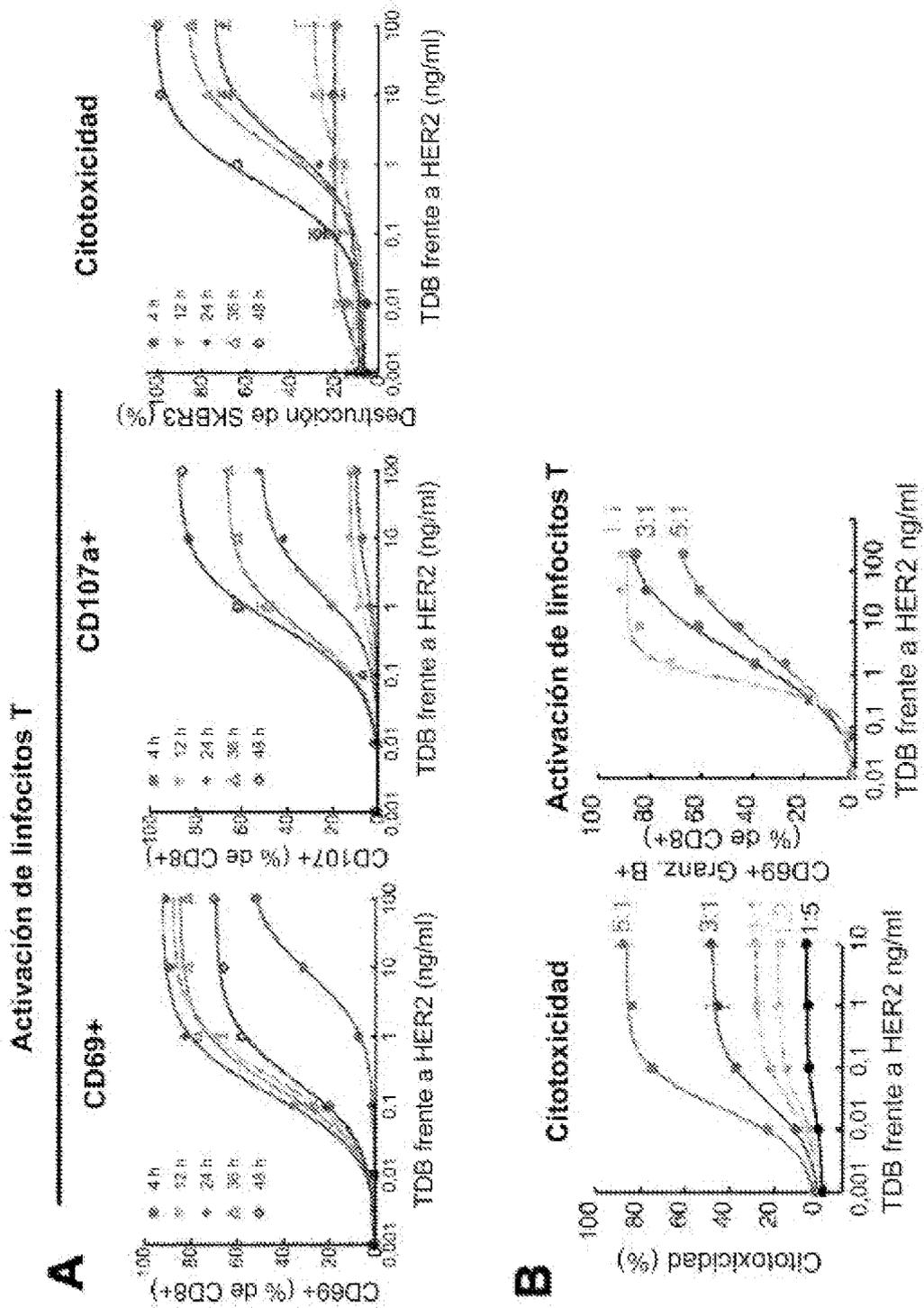
Figuras 92A-92D



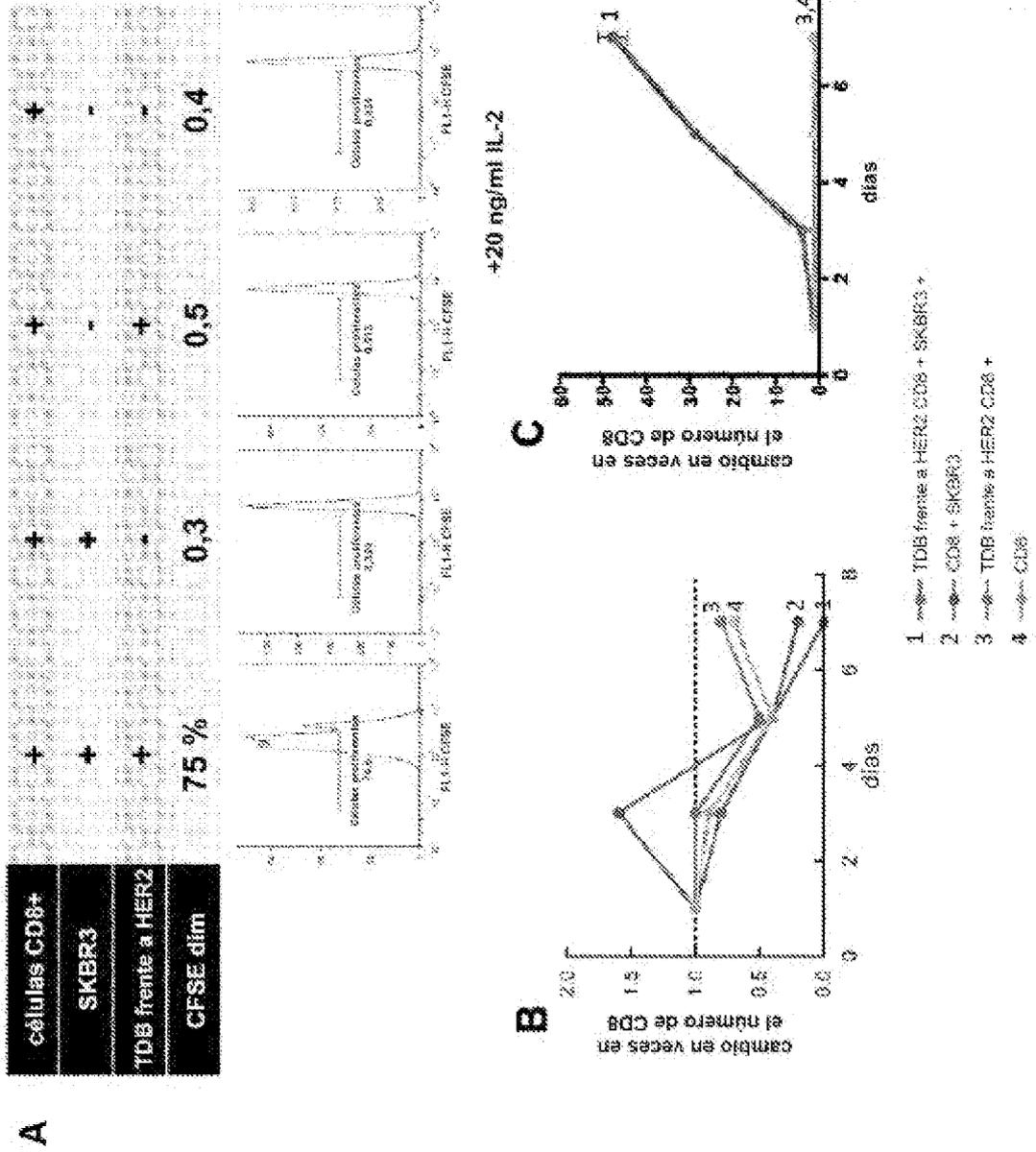
Figuras 93A-93F



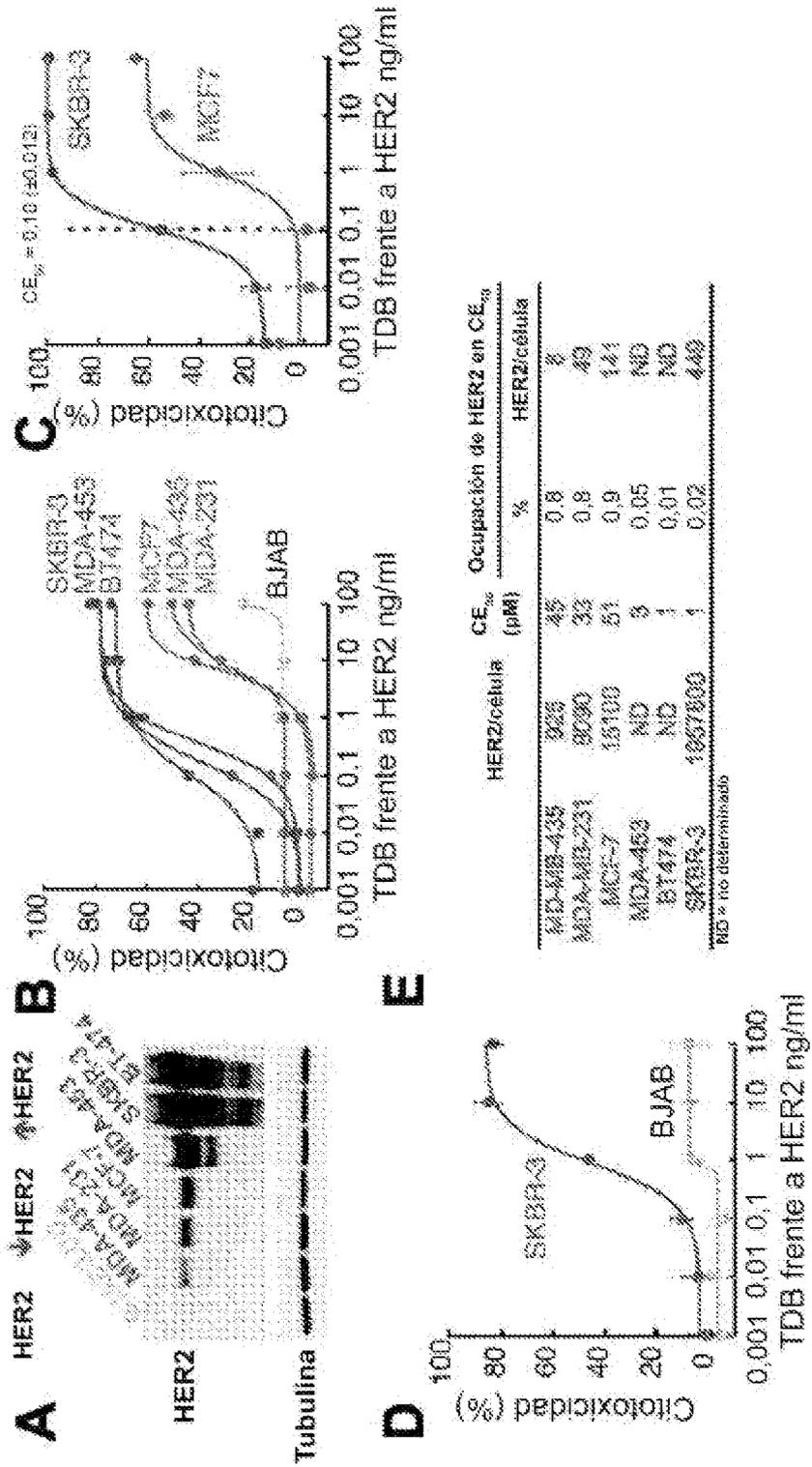
**Figuras 94A-94B**



Figuras 95A-95C



Figuras 96A-96E



Figuras 97A-97C

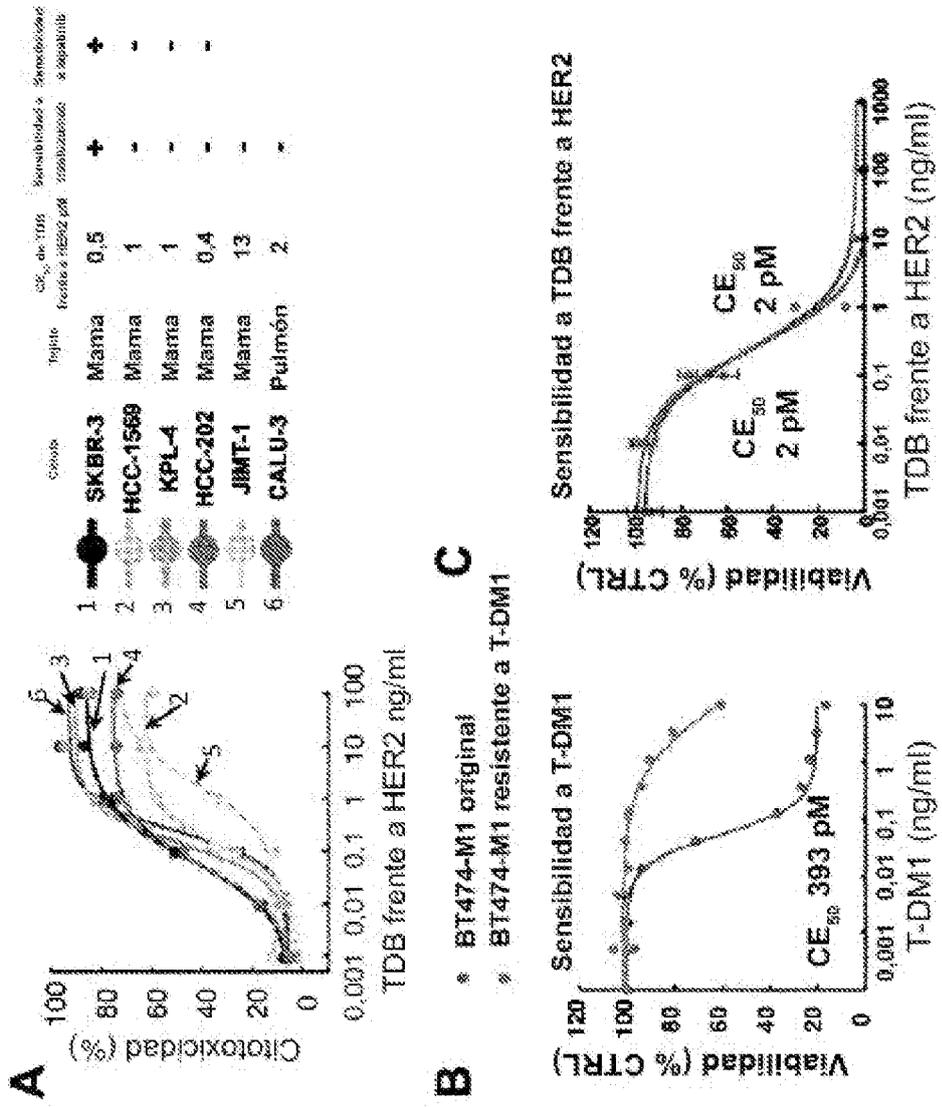
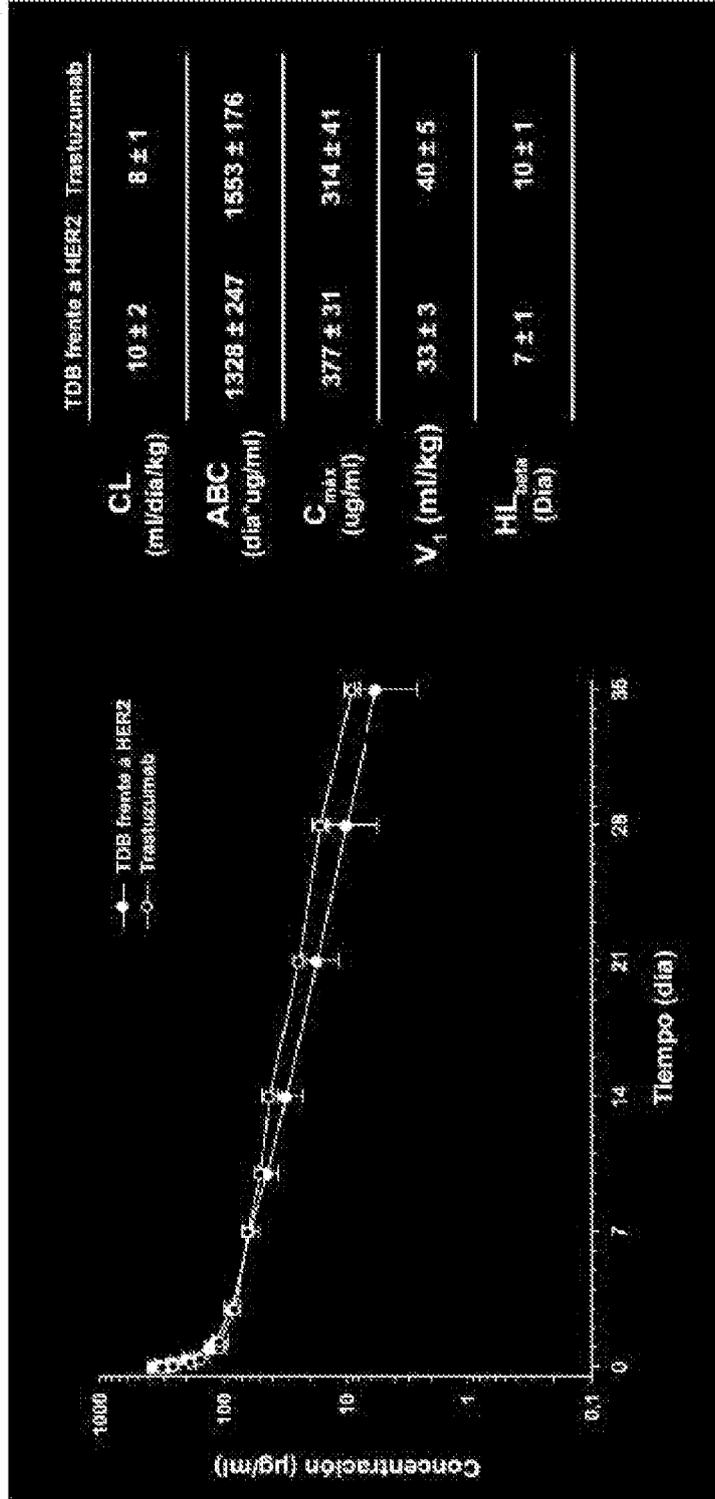
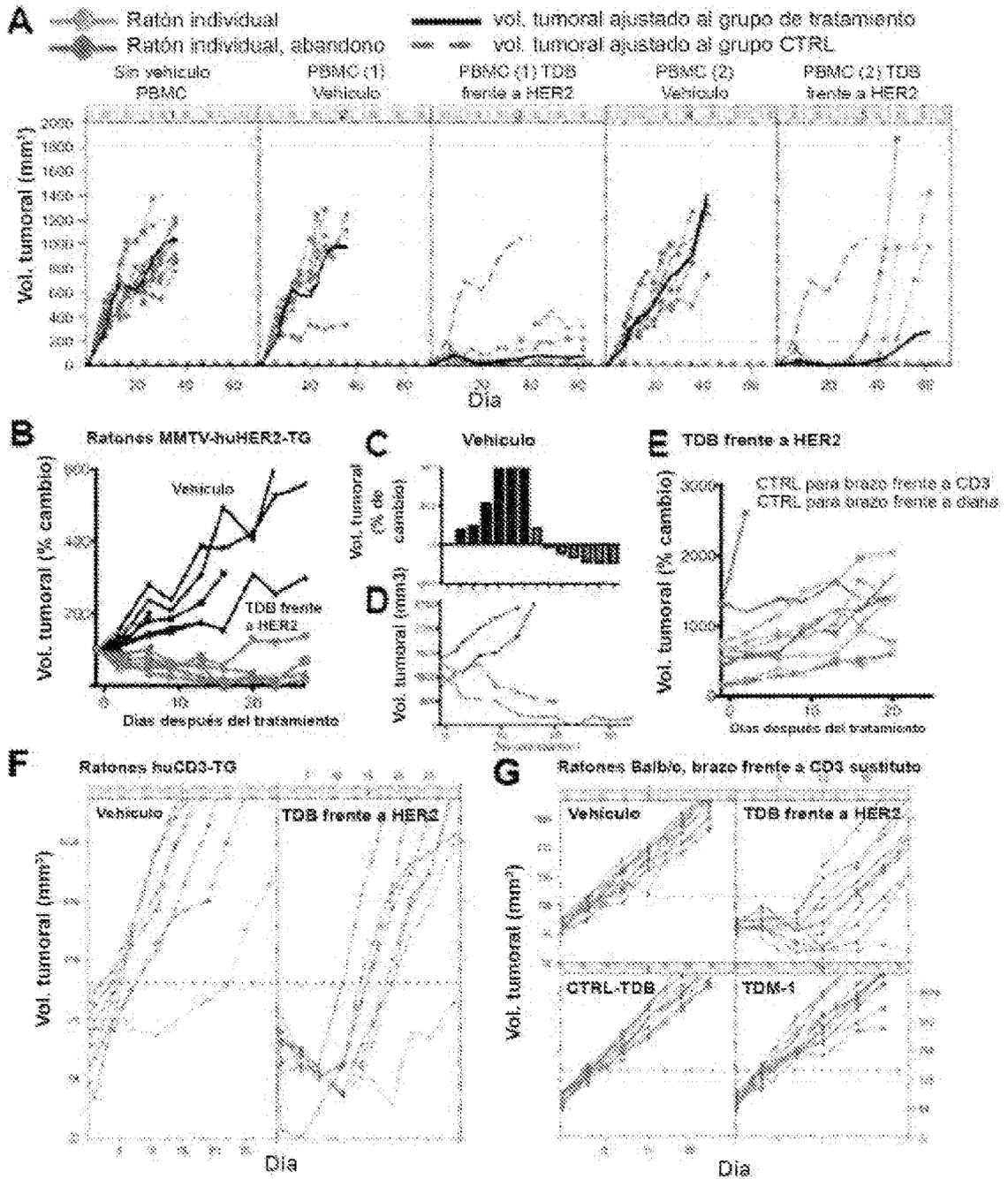


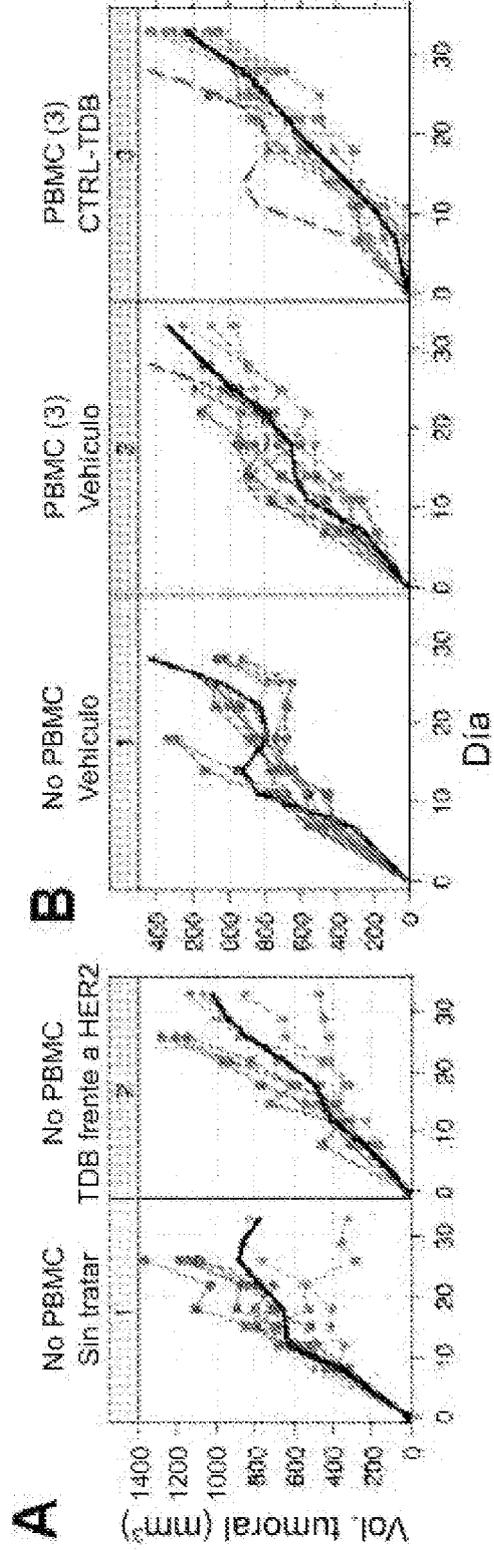
Figura 98



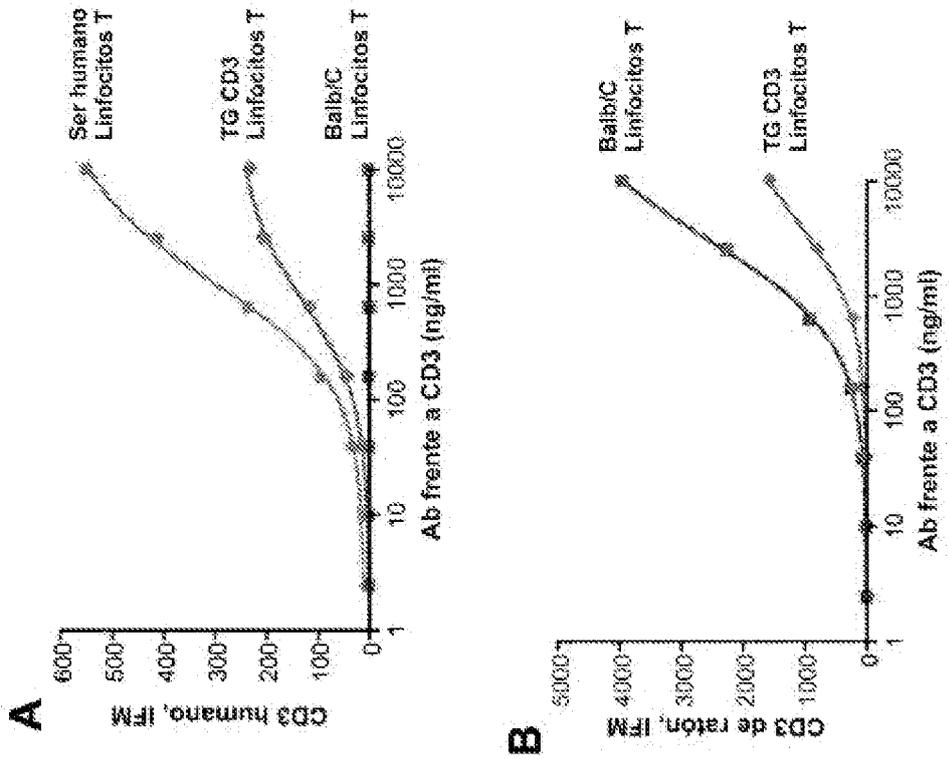
Figuras 99A-99G



**Figuras 100A-100B**



Figuras 101A-101B



Figuras 102A-102B

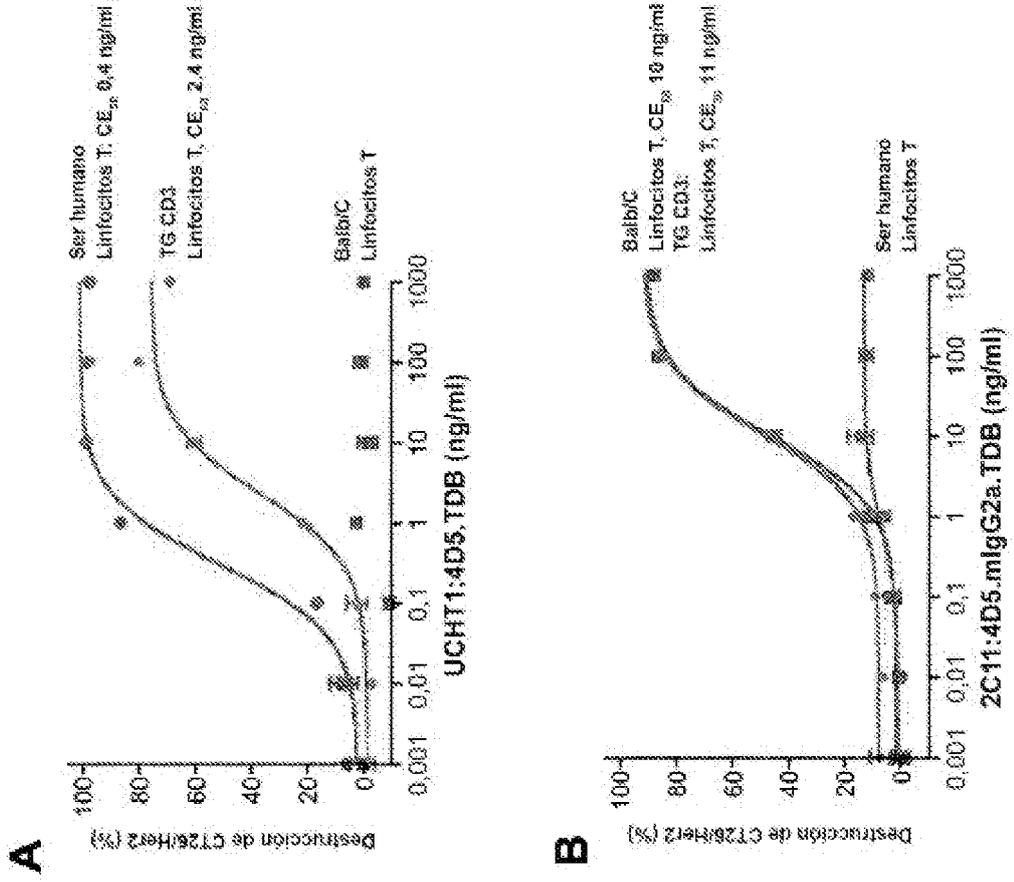


Figura 103

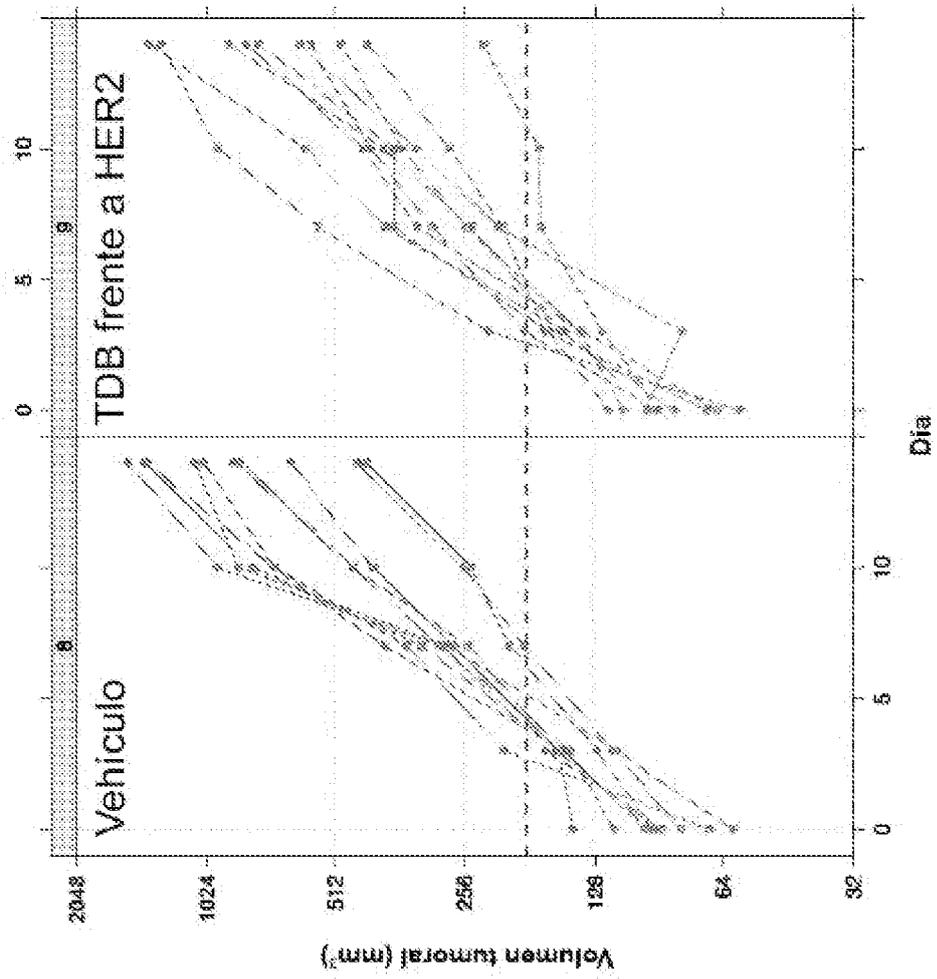


Figura 104

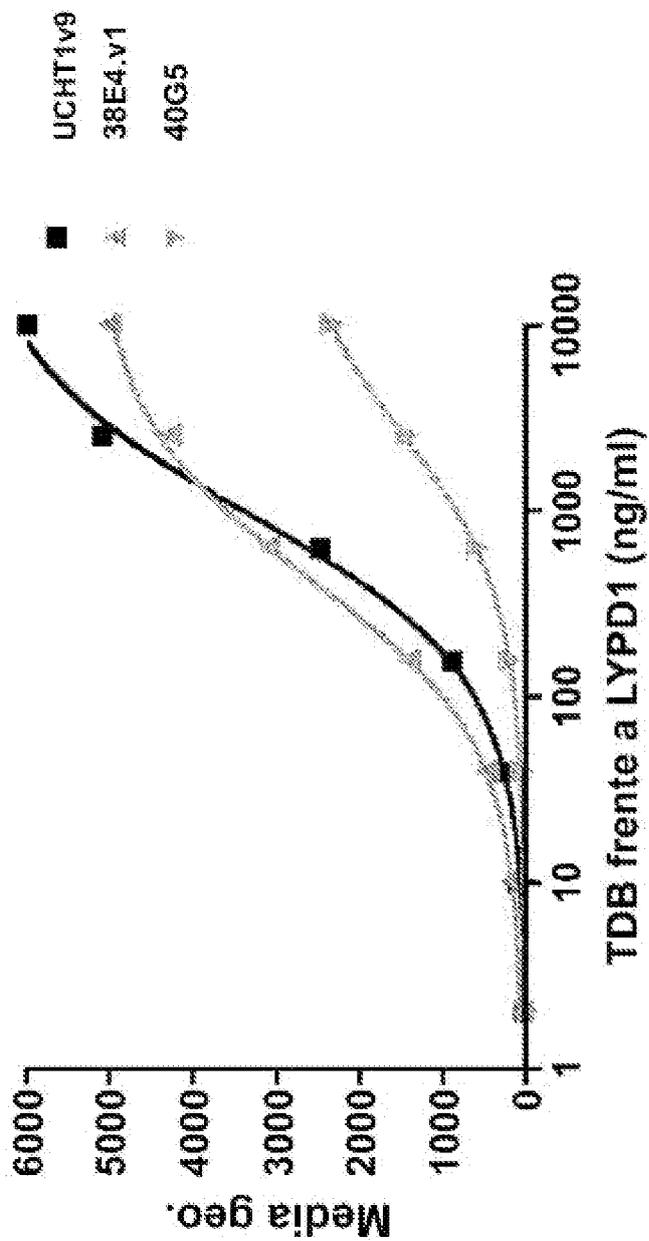


Figura 105

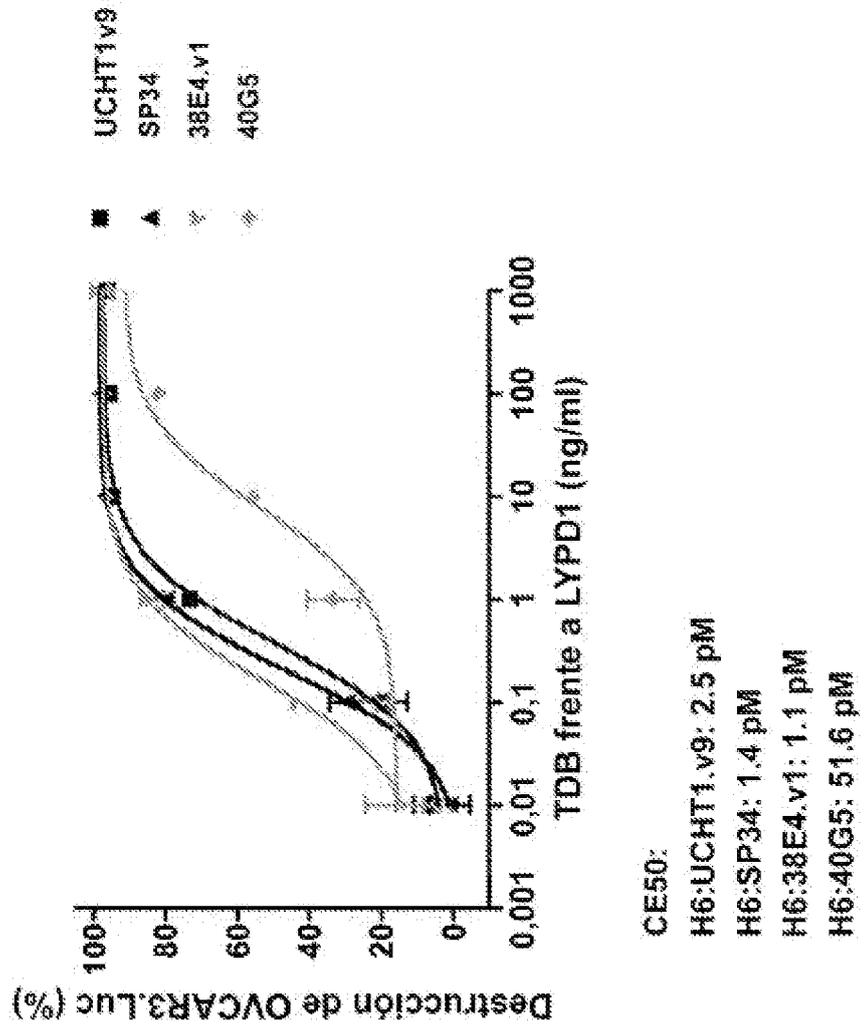
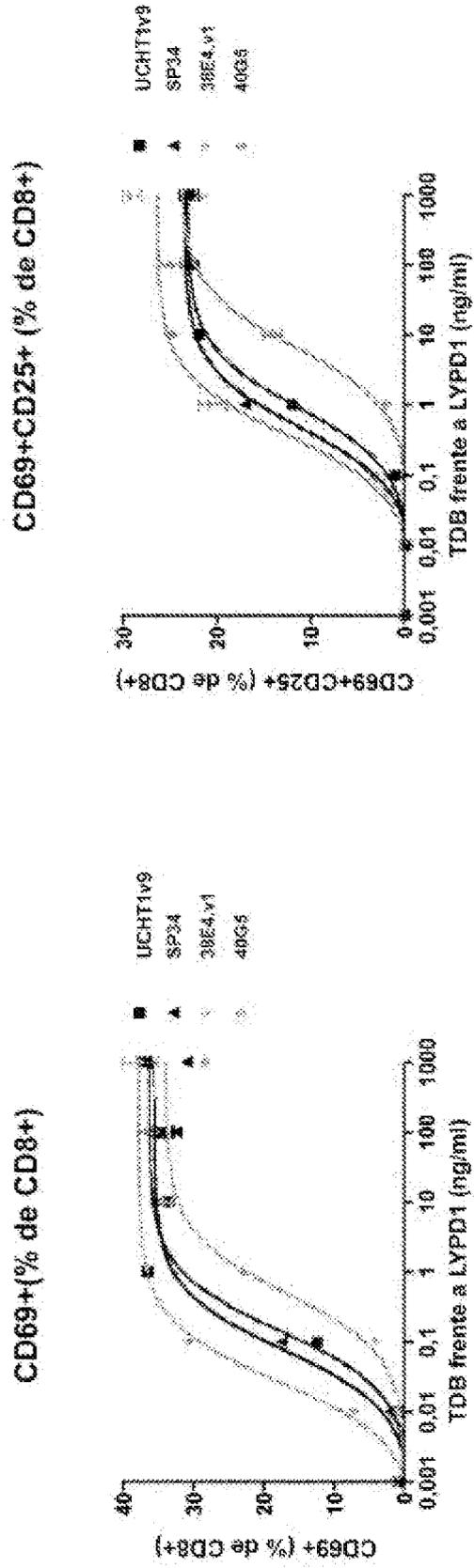


Figura 106



**Figura 107**

**Región variable de la cadena ligera de anti-RET41205.v6**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC**RASKSISKYLA**WYQQKPGKANKLLIS**SGSTLOS**GVPSRFGSGGTDFTLTISSLQPEDFAT  
 YIC**QQHNEYPWIFGQGT**KVEIK (SEQ ID NO: 620)

**Región variable de la cadena pesada de anti-RET41205.v6**

EVQLVESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSD**YYW**NWIRQPPGKGLEWIGY**IHYSGGTSYNPSLKS**RVTISRDTSKNQFSLKLS  
 SVTAADTAVYYCARG**NYD**W**AFAY**WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 619)

Figuras 108A-108B

