

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 989 110**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/42** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2014 PCT/JP2014/079785**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15068847**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2014 E 14859814 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 3070168**

---

(54) Título: **Molécula de unión a antígeno que contiene región variable de anticuerpo modificada**

(30) Prioridad:

**11.11.2013 JP 2013232803**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.11.2024**

(73) Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)**  
5-1, Ukimido 5-chome  
Kita-ku Tokyo 115-8543, JP

(72) Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI;**  
**KADONO, SHOJIRO;**  
**HIRONIWA, NAOKA y**  
**SAKURAI, MIKA**

(74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 989 110 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

Molécula de unión a antígeno que contiene región variable de anticuerpo modificada

**5 Campo técnico**

La presente invención proporciona un anticuerpo que comprende: una región variable de anticuerpo que puede unirse a dos antígenos diferentes (primer antígeno y segundo antígeno), pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo; y una región variable de anticuerpo que se une a un tercer antígeno diferente de estos antígenos, a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención, y a un método para producir el anticuerpo de la presente invención.

**Antecedentes de la técnica**

15 Los anticuerpos han recibido atención como fármacos debido a que tienen alta estabilidad en plasma y producen pocas reacciones adversas (Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078 (documento no de patente 1) y Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396 (documento no de patente 2)). Los anticuerpos no solo tienen un efecto de unión a antígeno y un efecto agonista o antagonista, sino que inducen actividad citotóxica mediada por células efectoras (también denominadas funciones efectoras), tal como ADCC (citotoxicidad dependiente de anticuerpo), ADCP (fagocitosis celular dependiente de anticuerpo) o CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Particularmente, los anticuerpos de la subclase de IgG1 muestran las funciones efectoras para células cancerosas. Por tanto, se ha desarrollado un gran número de fármacos de anticuerpos en el campo de la oncología.

25 Para ejercer la ADCC, ADCP o CDC de los anticuerpos, sus regiones Fc deben unirse a receptores de anticuerpos (Fc $\gamma$ R) presentes en las células efectoras (tales como células NK o macrófagos) y diversos componentes del complemento. En seres humanos, se han notificado las isoformas Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIIa y Fc $\gamma$ RIIIb como la familia de proteínas de Fc $\gamma$ R, y también se han notificado sus respectivos alotipos (Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65 (documento no de patente 3)). De estas isoforms, Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIIa tienen, en sus dominios intracelulares, un dominio denominado ITAM (motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina), que transduce señales de activación. En cambio, solo Fc $\gamma$ RIIb tiene, en su dominio intracelular, un dominio denominado ITIM (motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina), que transduce señales de inhibición. Se sabe que todas estas isoformas de Fc $\gamma$ R transducen señales a través de reticulación mediante complejos inmunitarios o similares (Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47 (documento no de patente 4)). De hecho, cuando los anticuerpos ejercen funciones efectoras contra células cancerosas, las moléculas de Fc $\gamma$ R en membranas de células efectoras se agrupan mediante las regiones Fc de una pluralidad de anticuerpos unidos sobre las membranas de células cancerosas y de ese modo transducen señales de activación a través de las células efectoras. Como resultado, se ejerce un efecto de destrucción celular. Con respecto a esto, se restringe la reticulación de Fc $\gamma$ R a células efectoras ubicadas cerca de las células cancerosas, mostrando que la activación de inmunidad está localizada en las células cancerosas (Ann. Rev. Immunol. (1988), 6, 251-81 (documento no de patente 5)).

40 Las inmunoglobulinas que se producen de manera natural se unen a antígenos a través de sus regiones variables y se unen a receptores tales como Fc $\gamma$ R, FcRn, Fc $\alpha$ R y Fc $\epsilon$ R o complementos a través de sus regiones constantes. Cada molécula de FcRn (molécula de unión que interacciona con una región Fc de IgG) se une a cada cadena pesada de un anticuerpo en una conexión de uno a uno. Por tanto, dos moléculas de FcRn se unen supuestamente a una molécula de anticuerpo de tipo IgG. A diferencia de FcRn, etc., Fc $\gamma$ R interacciona con una región bisagra de anticuerpo y dominios CH2, y solo una molécula de Fc $\gamma$ R se une a una molécula de anticuerpo de tipo IgG (J. Bio. Chem., (2000) 276, 16469-16477). Para la unión entre Fc $\gamma$ R y la región Fc de un anticuerpo, se ha encontrado que algunos residuos de aminoácido en la región bisagra y los dominios CH2 del anticuerpo y las cadenas de azúcar añadidas a Asn 297 (numeración de EU) de los dominios CH2 son importantes (Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110 (documento no de patente 6), Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104 (documento no de patente 7), e Immunol. (1995) 86, 319-324 (documento no de patente 8)). Anteriormente se han estudiado variantes de región Fc que tienen diversas propiedades de unión a Fc $\gamma$ R centrándose en este sitio de unión, para proporcionar variantes de región Fc que tienen una actividad de unión superior frente a Fc $\gamma$ R activante (documento WO2000/042072 (documento de patente 1) y documento WO2006/019447 (documento de patente 2)). Por ejemplo, Lazar *et al.* han aumentado satisfactoriamente la actividad de unión de IgG1 humana frente a Fc $\gamma$ RIIIa humano (V158) hasta aproximadamente 370 veces sustituyendo Ser 239, Ala 330 y Ile 332 (numeración de EU) de la IgG1 humana por Asn, Leu y Glu, respectivamente (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103, 4005-4010 (documento no de patente 9) y documento WO2006/019447 (documento de patente 2)). Esta forma alterada tiene aproximadamente 9 veces la actividad de unión de un tipo natural en cuanto a la razón de Fc $\gamma$ RIIIa con respecto a Fc $\gamma$ IIb (razón A/I). Alternativamente, Shinkawa *et al.* han aumentado satisfactoriamente la actividad de unión frente a Fc $\gamma$ RIIIa hasta aproximadamente 100 veces delecionando fucosa de las cadenas de azúcar añadidas a Asn 297 (numeración de EU) (J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473 (documento no de patente 10)). Estos métodos pueden mejorar drásticamente la actividad de ADCC de IgG1 humana en comparación con IgG1 humana que se produce de manera natural.

65 Un anticuerpo de tipo IgG que se produce de manera natural normalmente reconoce y se une a un epítopo a través

- de su región variable (Fab) y, por tanto, solo puede unirse a un antígeno. Mientras tanto, se sabe que muchos tipos de proteínas participan en el cáncer o la inflamación, y estas proteínas pueden producir interferencia entre sí. Por ejemplo, se sabe que algunas citocinas inflamatorias (TNF, IL1 e IL6) participan en enfermedad inmunológica (Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10 (documento no de patente 11)). Además, se conoce la activación de otros receptores como 5 mecanismo subyacente a la adquisición de resistencia a fármaco por cáncer (Endocr Relat Cancer (2006) 13, 45-51 (documento no de patente 12)). En tal caso, el anticuerpo habitual, que reconoce un epítopo, no puede inhibir una pluralidad de proteínas.
- 10 Se han estudiado anticuerpos que se unen a dos o más tipos de antígenos mediante una molécula (documento de patente 3) (estos anticuerpos se denominan anticuerpos biespecíficos) como moléculas que inhiben una pluralidad de dianas. La actividad de unión frente a dos antígenos diferentes (primer antígeno y segundo antígeno) puede conferirse mediante la modificación de anticuerpos de tipo IgG que se producen de manera natural (mAbs (2012), 1 de marzo, 4 (2)). Por tanto, un anticuerpo de este tipo no solo tiene el efecto de neutralizar estos dos o más tipos de antígenos mediante una molécula, sino el efecto de potenciar la actividad antitumoral a través de la reticulación de células que 15 tienen actividad citotóxica a células cancerosas. Una molécula con un sitio de unión a antígeno añadido al extremo N o C-terminal de un anticuerpo (DVD-Ig y scFv-IgG), una molécula que tiene diferentes secuencias de dos regiones Fab de un anticuerpo (anticuerpo biespecífico de cadena L común e hibridoma híbrido), una molécula en la que una región Fab reconoce dos antígenos (IgG de dos en una) y una molécula que tiene un bucle de dominio CH3 como otro sitio de unión a antígeno (Fcab) se han notificado anteriormente como formas moleculares del anticuerpo biespecífico 20 (Nat. Rev. (2010), 10, 301-316 (documento no de patente 13) y Peds (2010), 23 (4), 289- 297 (documento no de patente 14) así como los documentos no de patente 21 y 22). Dado que cualquiera de estos anticuerpos biespecíficos interacciona en sus regiones Fc con Fc $\gamma$ R, se conservan las funciones efectoras de anticuerpo en los mismos. Por tanto, el anticuerpo biespecífico se une a cualquier antígeno reconocido por el mismo al mismo tiempo con unión a Fc $\gamma$ R y muestra actividad de ADCC frente a células que expresan el antígeno. También se han notificado moléculas 25 de F(ab') $_2$  triespecíficas (documento no de patente 23).
- 30 Con la condición de que todos los antígenos reconocidos por el anticuerpo biespecífico sean antígenos específicamente expresados en cáncer, el anticuerpo biespecífico que se une a cualquiera de los antígenos muestra actividad citotóxica frente a células cancerosas y, por tanto, puede esperarse que tenga un efecto anticanceroso más eficiente que el del fármaco de anticuerpo convencional que reconoce un antígeno. Sin embargo, en el caso en el que uno cualquiera de los antígenos reconocidos por el anticuerpo biespecífico se expresa en un tejido normal o es una célula expresada en inmunocitos, se produce daño en el tejido normal o liberación de citocinas debido a la reticulación 35 con Fc $\gamma$ R (J. Immunol. (1999), 1 de agosto, 163 (3), 1246-52 (documento no de patente 15)). Como resultado, se inducen fuertes reacciones adversas.
- 35 Por ejemplo, se conoce catumaxomab como anticuerpo biespecífico que reconoce una proteína expresada en células T y una proteína expresada en células cancerosas (antígeno cancerígeno). Catumaxomab se une, en dos Fab, al antígeno cancerígeno (EpCAM) y a una cadena CD3 $\epsilon$  expresada en células T, respectivamente. Catumaxomab induce actividad citotóxica mediada por células T mediante unión al antígeno cancerígeno y al CD3 $\epsilon$  al mismo tiempo, e 40 induces actividad citotóxica mediada por células NK o por células presentadoras de (por ejemplo, macrófagos) mediante unión al antígeno cancerígeno y a Fc $\gamma$ R al mismo tiempo. Mediante uso de estas dos actividades citotóxicas, catumaxomab muestra un alto efecto terapéutico sobre ascitis malignas mediante administración intraperitoneal y, por tanto, se ha aprobado en Europa (Cancer Treat Rev. (2010), octubre 36 (6), 458-67 (documento no de patente 16)). Además, se notifica que la administración de catumaxomab proporciona anticuerpos reactivos frente a células 45 cancerosas en algunos casos, demostrando que se induce inmunidad adquirida (Future Oncol. (2012), 8 de enero (1), 73-85 (documento no de patente 17)). A partir de este resultado, anticuerpos de este tipo que tienen tanto actividad citotóxica mediada por células T como el efecto provocado por células tales como células NK o macrófagos mediante Fc $\gamma$ R (estos anticuerpos se denominan particularmente anticuerpos trifuncionales) han recibido atención porque puede 50 esperarse un fuerte efecto antitumoral e inducción de inmunidad adquirida.
- 55 Sin embargo, los anticuerpos trifuncionales se unen a CD3 $\epsilon$  y a Fc $\gamma$ R al mismo tiempo incluso en ausencia de un antígeno cancerígeno y, por tanto, reticulan células T que expresan CD3 $\epsilon$  a células que expresan Fc $\gamma$ R incluso en un entorno libre de células cancerosas para producir diversas citocinas en grandes cantidades. Tal inducción independiente de antígeno cancerígeno de la producción de diversas citocinas restringe la administración actual de los anticuerpos trifuncionales a una vía intraperitoneal (Cancer Treat Rev., octubre de 2010 36 (6), 458-67 (documento no de patente 16)). Los anticuerpos trifuncionales son muy difíciles de administrar de manera sistémica debido a graves reacciones adversas de tipo tormenta de citocinas (Cancer Immunol Immunother., septiembre de 2007; 56 (9): 1397-406 (documento no de patente 18)).
- 60 El anticuerpo biespecífico de la técnica convencional puede unirse a ambos antígenos, es decir, a un primer antígeno, antígeno cancerígeno (EpCAM), y a un segundo antígeno, CD3 $\epsilon$ , al mismo tiempo con unión a Fc $\gamma$ R, y, por tanto, no puede evitar, a la vista de su estructura molecular, tales reacciones adversas provocadas por la unión a Fc $\gamma$ R y al segundo antígeno CD3 $\epsilon$  al mismo tiempo. Se han notificado anticuerpos con dominios variables que tienen especificidad doble (documentos no de patente 19 y 20).

En los últimos años, se ha proporcionado un anticuerpo modificado, que provoca actividad citotóxica mediada por células T al tiempo que se evitan reacciones adversas, mediante el uso de una región Fc que tiene actividad de unión reducida frente a FcγR (documento WO2012/073985).

5 Sin embargo, incluso un anticuerpo de este tipo no logra actuar sobre dos inmunorreceptores, es decir, CD3ε y FcγR, al tiempo que se une al antígeno cancerígeno, a la vista de su estructura molecular.

10 Aún no se conoce un anticuerpo que ejerza tanto actividad citotóxica mediada por células T como actividad citotóxica mediada por células distintas de las células T de una manera específica de antígeno cancerígeno al tiempo que se eviten reacciones adversas.

#### **Lista de referencias**

##### **Bibliografía de patentes**

- 15 Documento de patente 1: documento WO2000/042072  
 Documento de patente 2: documento WO2006/019447  
 20 Documento de patente 3: documento WO2012/162067

##### **Bibliografía no de patentes**

- 25 Documento no de patente 1: Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078  
 Documento no de patente 2: Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396  
 Documento no de patente 3: Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65  
 30 Documento no de patente 4: Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47  
 Documento no de patente 5: Ann. Rev. Immunol. (1988). 6, 251-81  
 Documento no de patente 6: Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110  
 35 Documento no de patente 7: Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104  
 Documento no de patente 8: Immunol. (1995) 86, 319-324  
 40 Documento no de patente 9: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103, 4005-4010  
 Documento no de patente 10: J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473  
 Documento no de patente 11: Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10  
 45 Documento no de patente 12: Endocr Relat Cancer (2006) 13, 45-51  
 Documento no de patente 13: Nat. Rev. (2010), 10, 301-316  
 50 Documento no de patente 14: Peds (2010), 23 (4), 289-297  
 Documento no de patente 15: J. Immunol. (1999), 1 de agosto, 163 (3), 1246-52  
 Documento no de patente 16: Cancer Treat Rev. (2010), octubre 36 (6), 458-67  
 55 Documento no de patente 17: Future Oncol. (2012), 8 de enero (1), 73-85  
 Documento no de patente 18: Cancer Immunol Immunother., septiembre de 2007; 56 (9): 1397-406  
 60 Documento no de patente 19: Cancer Cell., 20 de septiembre de 2011; 20(4): 472-486  
 Documento no de patente 20: Curr Opin Chem Biol., junio de 2013; 17(3): 400-405  
 Documento no de patente 21: J Biotechnol., septiembre de 2011; 155(2): 193-202  
 65 Documento no de patente 22: Int J Cancer., noviembre de 2004; 112(2): 279-85

Documento no de patente 23: J Immunol., julio de 1991; 147(1): 60-69

5 **Sumario de la invención**

10 **Problema técnico**

La presente invención se ha realizado a la vista de estas circunstancias. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo que comprenda: una región variable de anticuerpo que tenga actividad de unión frente a dos antígenos diferentes (primer antígeno y segundo antígeno), pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo; y una región variable que se une a un antígeno (tercer antígeno) diferente de estos antígenos, una composición farmacéutica que comprenda el anticuerpo de la presente invención, y un método para producir el anticuerpo de la presente invención.

15 **Solución al problema**

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios laboriosos para alcanzar el objetivo. Como resultado, los presentes inventores han preparado satisfactoriamente un anticuerpo que comprende: una región variable de anticuerpo que tiene actividad de unión frente a dos antígenos diferentes (primer antígeno y segundo antígeno), pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo; y una región variable que se une a un antígeno (tercer antígeno) diferente de estos antígenos, y actividad potenciada provocada por este anticuerpo mediante el uso de la actividad de unión del anticuerpo frente a los tres antígenos diferentes. Además, los presentes inventores han preparado satisfactoriamente un anticuerpo que puede evitar la reticulación entre diferentes células resultante de la unión de una molécula de unión a antígeno multiespecífica convencional a antígenos expresados en las diferentes células, lo cual se considera que es responsable de reacciones adversas cuando se usa la molécula de unión a antígeno multiespecífica como fármaco.

La invención se refiere a las realizaciones tal como se definen en las reivindicaciones. La siguiente descripción usa con frecuencia el término "molécula de unión a antígeno". En relación con la invención reivindicada, se entiende que el término "molécula de unión a antígeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un "anticuerpo".

30 **Breve descripción de los dibujos**

35 [Figura 1] La figura 1 es un diagrama conceptual de un anticuerpo que se une a un primer antígeno y a un segundo antígeno, pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo.

[Figura 2] La figura 2 es un diagrama conceptual de un anticuerpo que no provoca reticulación porque el anticuerpo no se une a dos antígenos al mismo tiempo.

40 [Figura 3] La figura 3 es un diagrama conceptual de un anticuerpo que se une a dos antígenos al mismo tiempo, pero no une dos células al mismo tiempo.

[Figura 4] La figura 4 es un diagrama conceptual de un anticuerpo que reticula una célula cancerosa a una célula T que expresa un primer receptor.

45 [Figura 5] La figura 5 es un diagrama conceptual de un anticuerpo que reticula una célula cancerosa a una célula que expresa un segundo receptor.

50 [Figura 6] La figura 6 es un diagrama conceptual de un anticuerpo que reticula una célula cancerosa a un inmunocito, pero no reticula inmunocitos.

[Figura 7] La figura 7 es un gráfico que muestra resultados de ELISA de células de CE115 para CD3ε.

55 [Figura 8] La figura 8 es un diagrama que muestra la forma molecular de EGFR\_ERY22\_CE115.

[Figura 9] La figura 9 es un gráfico que muestra resultados de TDCC (SK-pca13a) de EGFR\_ERY22\_CE115.

[Figura 10] La figura 10 es un gráfico que muestra la actividad de unión de CE115 humanizado frente a CD3ε.

60 [Figura 11] La figura 11 es un gráfico que muestra resultados de ECL-ELISA para detectar la unión de CE115 con inserción de RGD a integrina.

[Figura 12] La figura 12 es un gráfico que muestra resultados de ECL-ELISA para detectar la unión de CE115 con inserción de RGD a CD3ε.

65 [Figura 13] La figura 13 es un gráfico que muestra resultados de ECL-ELISA para detectar la unión de CE115 con

inserción de RGD a integrina y CD3 $\epsilon$  al mismo tiempo. Se muestran los resultados sobre formas alteradas que se unen a los mismos al mismo tiempo.

5 [Figura 14] La figura 14 es un gráfico que muestra resultados de ECL-ELISA para detectar la unión de CE115 con inserción de RGD a los antígenos al mismo tiempo. Se muestran los resultados sobre formas alteradas que no se unen a los antígenos al mismo tiempo.

10 [Figura 15] La figura 15 es un gráfico que muestra resultados de ECL-ELISA para detectar la unión de CE115 con inserción de péptido de unión a TLR2 a TLR2.

15 [Figura 16] La figura 16 es un gráfico que muestra resultados de ECL-ELISA para detectar la unión de CE115 con inserción de péptido de unión a TLR2 a CD3 $\epsilon$ .

[Figura 17] La figura 17 es un gráfico que muestra resultados de ECL-ELISA para detectar la unión de CE115 con inserción de péptido de unión a TLR2 a TLR2 y CD3 al mismo tiempo.

[Figura 18] La figura 18 es un sensograma a modo de ejemplo de un anticuerpo que tiene una razón de las cantidades unidas de menos de 0,8. Las ordenadas representan un valor de RU (respuesta). Las abscisas representan el tiempo.

20 [Figura 19] La figura 19 es un diagrama que muestra la unión de un dominio de Fab presentado por un fago a CD3 $\epsilon$  e IL6R.

25 [Figura 20] La figura 20 es un diagrama que muestra la unión de un dominio de Fab presentado por un fago a CD3 $\epsilon$  y a IgA humana (hlgA). NC designa su unión a una placa con antígeno no inmovilizado.

[Figura 21] La figura 21 es un diagrama que muestra la unión de un clon convertido en IgG a CD3 $\epsilon$  y a IgA humana (hlgA).

30 [Figura 22] La figura 22 es un diagrama que muestra que la unión de un clon convertido en IgG a IgA humana se inhibe mediante CD3 $\epsilon$  de modo que el clon no puede unirse a IgA humana (hlgA) y CD3 $\epsilon$  al mismo tiempo.

[Figura 23] La figura 23 es un diagrama que muestra la unión de un dominio de Fab presentado por un fago a CD3 $\epsilon$  y CD154 humano. NC designa su unión a una placa con antígeno no inmovilizado.

35 [Figura 24] La figura 24 es un diagrama que muestra la unión de un clon convertido en IgG a CD3 $\epsilon$  y CD154 humano.

[Figura 25] La figura 25 es un diagrama que muestra que la unión de un clon convertido en IgG a CD154 humano se inhibe mediante CD3 $\epsilon$  de modo que el clon no puede unirse a CD154 humano y CD3 $\epsilon$  al mismo tiempo.

#### 40 Descripción de realizaciones

En la presente invención, la “región variable de anticuerpo” habitualmente significa una región que comprende un dominio constituido por cuatro regiones de entramado (FR) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) flanqueadas por las mismas, y también incluye una secuencia parcial de la misma siempre que la secuencia parcial tenga la actividad de unión a una porción o la totalidad de un antígeno. Particularmente, se prefiere una región que comprende un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH). La región variable de anticuerpo de la presente invención puede tener una secuencia arbitraria y puede ser una región variable derivada de cualquier anticuerpo tal como un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de cabra, un anticuerpo de camello y un anticuerpo humanizado obtenido mediante la humanización de cualquiera de estos anticuerpos no humanos, y un anticuerpo humano. El “anticuerpo humanizado”, también denominado anticuerpo humano reconformado, se obtiene injertando regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de mamífero no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en CDR de anticuerpo humano. En la técnica se conocen métodos para identificar CDR (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; y Chothia *et al.*, Nature (1989) 342: 877). En la técnica también se conocen enfoques de recombinación génica generales para los mismos (véase la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 125023 y el documento WO 96/02576).

La “región variable de anticuerpo” de la presente invención que “no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo” significa que la región variable de anticuerpo de la presente invención no puede unirse al segundo antígeno en un estado unido con el primer antígeno, mientras que la región variable no puede unirse al primer antígeno en un estado unido con el segundo antígeno. En este contexto, la expresión “no unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo” también incluye no reticular una célula que expresa el primer antígeno a una célula que expresa el segundo antígeno, o no unirse al primer antígeno y al segundo antígeno expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo. Esta expresión incluye además el caso en el que la región variable puede unirse tanto al primer antígeno como al segundo antígeno al mismo tiempo cuando el primer antígeno y el segundo antígeno

- no se expresan en membranas celulares, como con proteínas solubles, o ambos residen en la misma célula, pero no puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo. Una región variable de anticuerpo de este tipo no está particularmente limitada siempre que la región variable de anticuerpo tenga estas funciones. Los ejemplos de la misma pueden incluir regiones variables derivadas de una región variable de anticuerpo de tipo IgG mediante la alteración de una porción de sus aminoácidos para unirse al antígeno deseado. El aminoácido que va a alterarse se selecciona, por ejemplo, de aminoácidos cuya alteración no cancela la unión al antígeno, en una región variable de anticuerpo que se une al primer antígeno o al segundo antígeno.
- En este contexto, la expresión "expresado en células diferentes" simplemente significa que los antígenos se expresan en células independientes. La combinación de tales células puede ser, por ejemplo, los mismos tipos de células tales como una célula T y otra célula T, o puede ser diferentes tipos de células tales como una célula T y una célula NK.
- Puede usarse una alteración de aminoácido sola o puede usarse una pluralidad de alteraciones de aminoácido en combinación.
- En el caso de usar una pluralidad de alteraciones de aminoácido en combinación, el número de las alteraciones que van a combinarse no está particularmente limitado y puede establecerse de manera apropiada dentro de un intervalo que puede alcanzar el objetivo de la invención. El número de las alteraciones que van a combinarse es, por ejemplo, de 2 o más y 30 o menos, preferiblemente 2 o más y 25 o menos, 2 o más y 22 o menos, 2 o más y 20 o menos, 2 o más y 15 o menos, 2 o más y 10 o menos, 2 o más y 5 o menos, o 2 o más y 3 o menos.
- La pluralidad de alteraciones de aminoácido que van a combinarse pueden añadirse únicamente al dominio variable de cadena pesada o al dominio variable de cadena ligera de anticuerpo o pueden estar distribuidas de manera apropiada tanto en el dominio variable de cadena pesada como en el dominio variable de cadena ligera.
- Uno o más residuos de aminoácido en la región variable son aceptables como residuo de aminoácido que va a alterarse siempre que se conserve la actividad de unión a antígeno. En el caso de alterar un aminoácido en la región variable, la región variable resultante conserva preferiblemente la actividad de unión del anticuerpo sin alterar correspondiente y tiene preferiblemente, por ejemplo, el 50 % o más, más preferiblemente el 80 % o más, de manera adicionalmente preferible el 100 % o más, de la actividad de unión antes de la alteración, aunque la región variable según la presente invención no se limita a lo mismo. La actividad de unión puede aumentarse mediante la alteración de aminoácido y puede ser, por ejemplo, 2 veces, 5 veces o 10 veces la actividad de unión antes de la alteración.
- La región para la alteración de aminoácido son regiones expuestas a disolvente y bucles en la región variable, es decir, CDR1, CDR2, CDR3 o FR3. Específicamente, se prefieren las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en el dominio variable de cadena L. Se prefieren más las posiciones de numeración de Kabat 31, de 52a a 61, de 71 a 74 y de 97 a 101 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 51 a 56 y de 89 a 96 en el dominio variable de cadena L are. Además, puede introducirse adicionalmente un aminoácido que aumenta la actividad de unión a antígeno en el momento de la alteración de aminoácido.
- En el presente documento, el "bucle" significa una región que contiene residuos que no participan en el mantenimiento de una estructura de barril  $\beta$  de inmunoglobulina.
- En la presente invención, la alteración de aminoácido significa inserción. Pueden usarse alteraciones de aminoácido de manera intercambiable con mutaciones de aminoácido y usarse en el mismo sentido con las mismas.
- La sustitución de un residuo de aminoácido se lleva a cabo mediante remplazo por otro residuo de aminoácido con el fin de alterar, por ejemplo, cualquiera de los siguientes puntos (a) a (c): (a) la estructura principal de polipéptido de una región que tiene una estructura de lámina o estructura de hélice; (b) la carga eléctrica o hidrofobia de un sitio diana; y (c) el tamaño de una cadena lateral.
- Los residuos de aminoácido se clasifican en los siguientes grupos basándose en propiedades generales de cadena lateral: (1) residuos hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu e Ile; (2) residuos hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn y Gln; (3) residuos ácidos: Asp y Glu; (4) residuos básicos: His, Lys y Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly y Pro; y (6) residuos aromáticos: Trp, Tyr y Phe.
- La sustitución de residuos de aminoácido dentro de cada uno de estos grupos se denomina sustitución conservativa, mientras que la sustitución de un residuo de aminoácido en uno de estos grupos por un residuo de aminoácido en otro grupo se denomina sustitución no conservativa.
- La sustitución puede ser la sustitución conservativa o puede ser la sustitución no conservativa. Alternativamente, pueden combinarse la sustitución conservativa y la sustitución no conservativa.
- La alteración de un residuo de aminoácido también incluye: la selección de una región variable que puede unirse al

primer antígeno y al segundo antígeno, pero no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo, de las obtenidas mediante la alteración aleatoria de aminoácidos cuya alteración no cancela la unión al antígeno, en la región variable de anticuerpo que se une al primer antígeno o al segundo antígeno; y alteración para insertar un péptido que se sabe anteriormente que tiene actividad de unión frente al antígeno deseado, en la región anteriormente mencionada. Los ejemplos del péptido que se sabe anteriormente que tiene actividad de unión frente al antígeno deseado incluyen los péptidos mostrados en la tabla 1.

[Tabla 1]

Pareja de unión/proteína de interés	Referencias
VEGFR	J Biol Chem., 8 de noviembre de 2002; 277(45): 43137-42. Publicación electrónica el 14 de agosto de 2002, EMBO J., 3 de abril de 2000; 19(7):1525-33, J Med Chem., 10 de junio de 2010; 53(11): 4428-40.
TNFR	Mol Immunol., julio de 2004; 41(8):741-9, Eur J Pharmacol., 10 de abril de 2011; 656(1-3):119-24.
TLR5	J Immunol 2010; 185: 1744-1754
TLR4	PLoS ONE, febrero de 2012   volumen 7   número 2   e30839
TLR2	Documento WO2006/083706A2,
Receptor de VLA de células T	Int Immunopharmacol., marzo de 2003; 3(3):435-43.
PDGFR	Biochemical Pharmacology (2003), 66(7), 1307-1317, FEBS Lett., 15 de diciembre de 1997; 419(2-3):166-70.
Naip5(NLR)	NATURE IMMUNOLOGY, VOLUMEN 9, NÚMERO 10, OCTUBRE DE 2008, 1171
Integrina	Documentos WO 95/14714, WO 97/08203, WO 98/10795, WO 99/24462, J. Biol. Chem. 274: 1979-1985
FcgRIIa	J Biol Chem., 9 de enero de 2009; 284(2):1126-35
EGFR	Journal of Biotechnology (2005), 116(3) 211-219
Agonista de DR5	Journal of Biotechnology (2006), 361(3) 522-536
CXCR4	Science 330, 1066 (2010); vol. 330, n.º 6007, págs. 1066-1071
CD40	Eur J Biochem., mayo de 2003; 270(10):2287-94.
CD154	J Mol Med (Berl.), febrero de 2009; 87(2):181-97.

- Según un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de anticuerpo con un aminoácido alterado en un dominio variable de cadena pesada de tal manera que la región variable puede unirse a un primer antígeno y a un segundo antígeno diferente del primer antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo. La región variable de anticuerpo que puede unirse a un primer antígeno y a un segundo antígeno diferente del primer antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo puede prepararse, por ejemplo, introduciendo la alteración de aminoácido (inserción) mencionada anteriormente en un dominio variable de cadena pesada. La posición en la que se introduce la alteración de aminoácido es preferiblemente un dominio variable de cadena pesada. Los ejemplos de una región más preferida incluyen regiones expuestas a disolvente y bucles en el dominio variable. Entre otros, se prefieren CDR1, CDR2, CDR3, FR3 y bucles. Específicamente, se prefieren las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en el dominio variable de cadena H. Se prefieren más las posiciones de numeración de Kabat 31, de 52a a 61, de 71 a 74 y de 97 a 101 en el dominio variable de cadena H. Además, puede introducirse adicionalmente un aminoácido que aumenta la actividad de unión a antígeno en el momento de la alteración de aminoácido.
- En la región variable de anticuerpo de la presente invención, la alteración mencionada anteriormente puede combinarse con una alteración conocida en la técnica. Por ejemplo, la modificación de glutamina N-terminal de la región variable por ácido piroglutámico mediante piroglutamilación es una modificación bien conocida por los expertos en la técnica. Por tanto, el anticuerpo de la presente invención que tiene glutamina en el extremo N-terminal de su cadena pesada puede contener una región variable con esta glutamina N-terminal modificada para dar ácido piroglutámico.
- Una región variable de anticuerpo de este tipo puede tener además una alteración de aminoácido para mejorar, por ejemplo, unión a antígeno, farmacocinética, estabilidad o antigenicidad. La región variable de anticuerpo de la presente invención puede alterarse para tener actividad de unión dependiente del pH frente a un antígeno y de ese modo poder unirse de manera repetible al antígeno (documento WO2009/125825).
- Además, una alteración de aminoácido para cambiar la actividad de unión a antígeno según la concentración de un compuesto específico de tejido diana puede añadirse, por ejemplo, a una región variable de anticuerpo de este tipo que se une a un tercer antígeno (documento WO2013/180200).
- La región variable puede alterarse adicionalmente con el fin, por ejemplo, de potenciar la actividad de unión, mejorar la especificidad, reducir el pl, conferir propiedades de unión a antígeno dependientes del pH, mejorar la estabilidad

térmica de la unión, mejorar la solubilidad, mejorar la estabilidad frente a modificación química, mejorar la heterogeneidad derivada de una cadena de azúcar, evitar un epítopo de células T identificado mediante el uso de predicción *in silice* o ensayo basado en células T *in vitro* para la reducción de la inmunogenicidad, o introducir un epítopo de células T para la activación de células T regulatorias (mAbs 3: 243- 247, 2011).

5 Si la región variable de anticuerpo de la presente invención “puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno” puede determinarse mediante un método conocido en la técnica.

10 Esto puede determinarse, por ejemplo, mediante un método de electroquimioluminiscencia (método de ECL) (BMC Research Notes 2011, 4: 281).

15 Específicamente, por ejemplo, un anticuerpo de bajo peso molecular compuesto por una región que puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, por ejemplo, una región Fab, de una molécula de unión a antígeno marcada con biotina que va a someterse a prueba, o un anticuerpo monovalente (anticuerpo que carece de una de las dos regiones Fab portadas por un anticuerpo habitual) del mismo, se mezcla con el primer antígeno o el segundo antígeno marcado con sulfo-tag (complejo de Ru), y se añade la mezcla sobre una placa con estreptavidina inmovilizada. En esta operación, la molécula de unión a antígeno marcada con biotina que va a someterse a prueba se une a estreptavidina en la placa. Se desarrolla luz a partir de sulfo-tag y puede detectarse la señal de luminiscencia usando un dispositivo Sector Imager 600 o 2400 (MSD K.K.) o similar para confirmar de ese modo la unión de la región anteriormente mencionada de la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba al primer antígeno o al segundo antígeno.

20 Alternativamente, este ensayo puede llevarse a cabo mediante ELISA, FACS (clasificación celular activada por fluorescencia), ALPHAScreen (selección por ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado), el método BIACORE basado en un fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR), etc. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010).

25 Específicamente, el ensayo puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, un analizador de interacción Biacore (GE Healthcare Japan Corp.) basado en un fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR). El analizador Biacore incluye cualquier modelo, tal como Biacore T100, T200, X100, A100, 4000, 3000, 2000, 1000 o C. Puede usarse cualquier chip de sensor para Biacore, tal como un chip CM7, CM5, CM4, CM3, C1, SA, NTA, L1, HPA o Au, como chip de sensor. Se inmovilizan proteínas para capturar la molécula de unión a antígeno de la presente invención, tales como proteína A, proteína G, proteína L, anticuerpos anti-IgG humana, anticuerpos anti-Fab de IgG humana, anticuerpos anti-cadena L humana, anticuerpos anti-Fc humana, proteínas antigénicas o péptidos antigénicos, sobre el chip de sensor mediante un método de acoplamiento tal como acoplamiento de amina, acoplamiento de disulfuro o acoplamiento de aldehído. Se inyecta el primer antígeno o el segundo antígeno sobre el mismo como analito y se mide la interacción para obtener un sensograma. En esta operación, la concentración del primer antígeno o el segundo antígeno puede seleccionarse dentro del intervalo de unos pocos  $\mu\text{M}$  a unos pocos  $\text{pM}$  según la intensidad de interacción (por ejemplo, KD) de la muestra de ensayo.

30 40 Alternativamente, pueden inmovilizarse el primer antígeno o el segundo antígeno en lugar de la molécula de unión a antígeno sobre el chip de sensor, con los que a su vez se deja interaccionar la muestra de anticuerpo que va a evaluarse. Puede confirmarse si la región variable de anticuerpo de la molécula de unión a antígeno de la presente invención tiene actividad de unión frente al primer antígeno o al segundo antígeno basándose en un valor de constante de disociación (KD) calculado a partir del sensograma de la interacción o basándose en el grado de aumento del sensograma tras la acción de la muestra de molécula de unión a antígeno por encima del nivel antes de la acción.

45 50 55 El ensayo ALPHAScreen se lleva a cabo mediante la tecnología ALPHA usando dos tipos de perlas (donadora y aceptora) basándose en el siguiente principio: se detectan señales de luminiscencia únicamente cuando estas dos perlas están ubicadas en proximidad mediante la interacción biológica entre una molécula unida con la perla donadora y una molécula unida con la perla aceptora. Un fotosensibilizador excitado por láser en la perla donadora convierte oxígeno ambiental en oxígeno singlete que tiene un estado excitado. El oxígeno singlete se difunde alrededor de la perla donadora y alcanza la perla aceptora ubicada en proximidad a la misma provocando de ese modo una reacción quimioluminiscente en la perla, que finalmente emite luz. En ausencia de la interacción entre la molécula unida con la perla donadora y la molécula unida con la perla aceptora, el oxígeno singlete producido por la perla donadora no alcanza la perla aceptora. Por tanto, no se produce ninguna reacción quimioluminiscente.

60 65 Una (ligando) de las sustancias entre las que tiene que observarse la interacción se inmoviliza sobre una película de oro delgada de un chip de sensor. Se irradia el chip de sensor con luz desde la parte trasera de tal manera que se produce reflexión total en la superficie de contacto entre la película de oro delgada y vidrio. Como resultado, se forma un sitio que tiene una caída de la intensidad de reflexión (señal de SPR) en una porción de luz reflejada. La otra (analito) de las sustancias entre las que tiene que observarse la interacción se inyecta sobre la superficie del chip de sensor. Con la unión del analito al ligando, se aumenta la masa de la molécula de ligando inmovilizada cambiando el índice de refracción del disolvente en la superficie de chip de sensor. Este cambio en el índice de refracción desplaza la posición de la señal de SPR (por el contrario, la disociación de las moléculas unidas devuelve la señal a la posición original). El sistema Biacore traza en las ordenadas la cantidad de desplazamiento, es decir, cambio en masa en la

superficie de chip de sensor, y presenta un cambio de masa dependiente del tiempo como datos de ensayo (sensograma). La cantidad del analito unido al ligando capturado sobre la superficie de chip de sensor (cantidad de cambio de respuesta en el sensograma entre antes y después de la interacción del analito) puede determinarse a partir del sensograma. Sin embargo, dado que la cantidad unida también depende de la cantidad del ligando, la comparación debe realizarse en condiciones en las que se usan sustancialmente las mismas cantidades del ligando. La cinética, es decir, una constante de tasa de asociación ( $k_a$ ) y una constante de tasa de disociación ( $k_d$ ), puede determinarse a partir de la curva del sensograma, mientras que la afinidad ( $K_D$ ) puede determinarse a partir de la razón entre estas constantes. También se usa preferiblemente un ensayo de inhibición en el método BIACORE. Se describen ejemplos del ensayo de inhibición en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010.

Si la molécula de unión a antígeno de la presente invención "no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo" puede confirmarse: confirmando que la molécula de unión a antígeno tiene actividad de unión frente al primer antígeno y al segundo antígeno; después dejando que cualquiera del primer antígeno o el segundo antígeno se una por adelantado a la molécula de unión a antígeno que comprende la región variable que tiene esta actividad de unión; y después determinando la presencia o ausencia de su actividad de unión frente al otro antígeno mediante el método mencionado anteriormente.

Alternativamente, esto también puede confirmarse determinando si la unión de la molécula de unión a antígeno a cualquiera del primer antígeno o el segundo antígeno inmovilizado en una placa de ELISA o un chip de sensor se inhibe mediante la adición del otro antígeno en la disolución.

Específicamente, en el caso de usar, por ejemplo, el método de ECL, se preparan una molécula de unión a antígeno marcada con biotina que va a someterse a prueba, el primer antígeno marcado con sulfo-tag (complejo de Ru) y un segundo antígeno no marcado. Cuando la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo, se detecta la señal de luminiscencia de sulfo-tag en ausencia del segundo antígeno no marcado añadiendo la mezcla de la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba y el primer antígeno sobre una placa con estreptavidina inmovilizada, seguido por desarrollo de luz. En cambio, la señal de luminiscencia se reduce en presencia del segundo antígeno. Esta reducción de la señal de luminiscencia puede cuantificarse para determinar la actividad de unión relativa.

En el caso de ALPHAScreen, la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba interacciona con el primer antígeno en ausencia del segundo antígeno competidor para generar señales de 520 a 620 nm. El segundo antígeno no marcado compite con el primer antígeno por la interacción con la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba. La reducción de la fluorescencia provocada como resultado de la competición puede cuantificarse para determinar de ese modo la actividad de unión relativa. La biotinilación de polipéptido usando sulfo-NHS-biotina o similar se conoce en la técnica. El primer antígeno puede marcarse con GST mediante un método adoptado de manera apropiada que implica, por ejemplo: fusionar un polinucleótido que codifica para el primer antígeno en marco con un polinucleótido que codifica para GST; y dejar que el gen de fusión resultante se exprese por células o similares que albergan vectores que pueden realizar la expresión del mismo, seguido por purificación usando una columna de glutatión. Las señales obtenidas se analizan preferiblemente usando, por ejemplo, software GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego) adaptado para un modelo de competición de un sitio basándose en análisis de regresión no lineal. Este análisis puede llevarse a cabo de manera similar usando el segundo antígeno marcado y el primer antígeno sin marcar.

Alternativamente, puede usarse un método que usa transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un fenómeno en el que se transfiere energía de excitación directamente entre dos moléculas fluorescentes ubicadas en proximidad entre sí mediante resonancia electrónica. Cuando se produce FRET, se transfiere la energía de excitación de un donador (molécula fluorescente que tiene un estado excitado) a un acceptor (otra molécula fluorescente ubicada cerca del donador) de modo que la fluorescencia emitida a partir del donador desaparece (en sentido preciso, se acorta la vida útil de la fluorescencia) y, en vez de eso, se emite la fluorescencia a partir del acceptor. Mediante el uso de este fenómeno, puede analizarse si es Fab doble o no. Por ejemplo, cuando el primer antígeno que porta un donador de fluorescencia y el segundo antígeno que porta un acceptor de fluorescencia se unen a la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba al mismo tiempo, la fluorescencia del donador desaparece mientras que se emite la fluorescencia del acceptor. Por tanto, se observa un cambio en la longitud de onda de fluorescencia. Se confirma que un anticuerpo de este tipo no tiene Fab doble. Por otro lado, si la mezcla del primer antígeno, el segundo antígeno y la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba no cambia la longitud de onda de fluorescencia del donador de fluorescencia unido con el primer antígeno, esta molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba puede considerarse como Fab doble.

Por ejemplo, se deja que una molécula de unión a antígeno marcada con biotina que va a someterse a prueba se una a estreptavidina en la perla donadora, mientras que se deja que el primer antígeno marcado con glutatión S transferasa (GST) se una a la perla aceptora. La molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba interacciona con el primer antígeno en ausencia del segundo antígeno competidor para generar señales de 520 a 620 nm. El segundo antígeno no marcado compite con el primer antígeno por la interacción con la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba. Puede cuantificarse una reducción de la fluorescencia provocada como resultado de la

- competición para determinar de ese modo la actividad de unión relativa. La biotinilación de polipéptido usando sulfo-NHS-biotina o similar se conoce en la técnica. El primer antígeno puede marcarse con GST mediante un método adoptado de manera apropiada que implica, por ejemplo: fusionar un polinucleótido que codifica para el primer antígeno en marco con un polinucleótido que codifica para GST; y dejar que el gen de fusión resultante se exprese por células o similares que albergan vectores que pueden realizar la expresión del mismo, seguido por purificación usando una columna de glutatión. Las señales obtenidas se analizan preferiblemente usando, por ejemplo, software GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego) adaptado para un modelo de competición de un sitio basándose en análisis de regresión no lineal.
- 5           10           15           20           25           30           35           40           45           50           55           60           65
- El marcaje no se limita a marcaje con GST y puede llevarse a cabo con cualquier etiqueta tal como, pero sin limitarse a, una etiqueta de histidina, MBP, CBP, una etiqueta Flag, una etiqueta de HA, una etiqueta de V5 o una etiqueta de c-myc. La unión de la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba a la perla donadora no se limita a la unión usando una reacción de biotina-estreptavidina. Particularmente, cuando la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba comprende Fc, un posible método implica dejar que la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba se una mediante una proteína que reconoce Fc tal como proteína A o proteína G en la perla donadora.
- Además, el caso en el que la región variable puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo cuando el primer antígeno y el segundo antígeno no se expresan en membranas celulares, como con proteínas solubles, o ambos residen en la misma célula, pero no pueden unirse al primer antígeno y al segundo antígeno expresados, cada uno, en una diferente célula, al mismo tiempo, también puede someterse a ensayo mediante un método conocido en la técnica.
- Específicamente, la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba que se ha confirmado que es positiva en ECL-ELISA para detectar la unión al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo también se mezcla con una célula que expresa el primer antígeno y una célula que expresa el segundo antígeno. Puede mostrarse que la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba no puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno expresados en células diferentes, al mismo tiempo, a menos que la molécula de unión a antígeno y estas células se unan entre sí al mismo tiempo. Este ensayo puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante ECL-ELISA basado en células. La célula que expresa el primer antígeno se inmoviliza sobre una placa por adelantado. Tras la unión de la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba a la misma, se añade la célula que expresa el segundo antígeno a la placa. Un antígeno diferente expresado únicamente en la célula que expresa el segundo antígeno se detecta usando un anticuerpo marcado con sulfo-tag frente a este antígeno. Se observa una señal cuando la molécula de unión a antígeno se une a los dos antígenos expresados respectivamente en las dos células, al mismo tiempo. No se observa ninguna señal cuando la molécula de unión a antígeno no se une a estos antígenos al mismo tiempo.
- Alternativamente, este ensayo puede llevarse a cabo mediante el método de ALPHAScreen. La molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba se mezcla con una célula que expresa el primer antígeno unido con la perla donadora y una célula que expresa el segundo antígeno unido con la perla aceptora. Se observa una señal cuando la molécula de unión a antígeno se une a los dos antígenos expresados en las dos células respectivamente, al mismo tiempo. No se observa ninguna señal cuando la molécula de unión a antígeno no se une a estos antígenos al mismo tiempo.
- Alternativamente, este ensayo también puede llevarse a cabo mediante un método de análisis de interacción Octet. En primer lugar, se deja que una célula que expresa el primer antígeno marcado con una etiqueta peptídica se una a un biosensor que reconoce la etiqueta peptídica. Se colocan una célula que expresa el segundo antígeno y la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba en pocillos y se analizan para detectar la interacción. Se observa un gran desplazamiento de longitud de onda provocado mediante la unión de la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba y la célula que expresa el segundo antígeno al biosensor cuando la molécula de unión a antígeno se une a los dos antígenos expresados en las dos células, respectivamente, al mismo tiempo. Se observa un pequeño desplazamiento de longitud de onda provocado por la unión tan solo de la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba al biosensor cuando la molécula de unión a antígeno no se une a estos antígenos al mismo tiempo.
- En vez de estos métodos basados en la actividad de unión, puede llevarse a cabo un ensayo basado en la actividad biológica. Por ejemplo, se mezclan una célula que expresa el primer antígeno y una célula que expresa el segundo antígeno con la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba y se cultivan. Se activan mutuamente los dos antígenos expresados en las dos células, respectivamente, mediante la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba cuando la molécula de unión a antígeno se une a estos dos antígenos al mismo tiempo. Por tanto, puede detectarse un cambio en la señal de activación, tal como un aumento en los niveles de fosforilación aguas abajo respectivos de los antígenos. Alternativamente, se induce producción de citocina como resultado de la activación. Por tanto, la cantidad de citocinas producida puede medirse confirmando de ese modo si se une o no a las dos células al mismo tiempo.
- En la presente invención, la "región Fc" se refiere a una región que comprende un fragmento que consiste en una bisagra o una porción de la misma y dominios CH2 y CH3 en una molécula de anticuerpo. La región Fc de la clase de

IgG significa, pero no se limita a, una región, por ejemplo, desde la cisteína 226 (numeración de EU (también denominada índice de EU en el presente documento)) hasta el extremo C-terminal o de la prolina 230 (numeración de EU) al extremo C-terminal. La región Fc puede obtenerse preferiblemente mediante la digestión parcial, por ejemplo, de un anticuerpo monoclonal de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 con una enzima proteolítica tal como pepsina seguida por la nueva elución de una fracción adsorbida sobre una columna de proteína A o una columna de proteína G. Una enzima proteolítica de este tipo no está particularmente limitada siempre que la enzima pueda digerir un anticuerpo completo para formar de manera restrictiva Fab o F(ab')<sub>2</sub> en condiciones de reacción establecidas de manera apropiada (por ejemplo, pH) de la enzima. Los ejemplos de la misma pueden incluir pepsina y papaína.

- 5            10          La molécula de unión a antígeno puede comprender además un péptido o una proteína que tiene una longitud de aproximadamente 5 o más aminoácidos. El péptido o la proteína no se limita a un péptido o una proteína derivado de un organismo, y puede ser, por ejemplo, un polipéptido que consiste en una secuencia diseñada de manera artificial. Además, puede usarse un polipéptido natural, un polipéptido sintético, un polipéptido recombinante o similares.
- 15          Los ejemplos preferidos del anticuerpo de la presente invención pueden incluir un anticuerpo que comprende una región Fc de anticuerpo.

Una región Fc derivada, por ejemplo, de IgG que se produce de manera natural puede usarse como "región Fc" de la presente invención. En este contexto, la IgG que se produce de manera natural significa un polipéptido que contiene 20          una secuencia de aminoácidos idéntica a la de IgG encontrada en la naturaleza y pertenece a una clase de un anticuerpo sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina gamma. La IgG humana que se produce de manera natural significa, por ejemplo, IgG1 humana que se produce de manera natural, IgG2 humana que se produce de manera natural, IgG3 humana que se produce de manera natural o IgG4 humana que se produce de manera natural. La IgG que se produce de manera natural también incluye variantes o similares derivadas de manera espontánea a partir de la misma. Se describe una pluralidad de secuencias de alotipo basándose en polimorfismo 25          génico como regiones constantes de anticuerpos de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana en Sequences of proteins of immunological interest, publicación de NIH n.º 91-3242, cualquiera de las cuales puede usarse en la presente invención. Particularmente, la secuencia de IgG1 humana puede tener DEL o EEM como secuencia de aminoácidos de las posiciones de numeración de EU de 356 a 358.

30          La región Fc de anticuerpo se encuentra, por ejemplo, como una región Fc de tipo IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM. Por ejemplo, una región Fc derivada de un anticuerpo de IgG humana que se produce de manera natural puede usarse como región Fc de anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, una región Fc derivada de una región constante de IgG que se produce de manera natural, específicamente, una región constante (SEQ ID NO: 35          1) originada a partir de IgG1 humana que se produce de manera natural, una región constante (SEQ ID NO: 2) originada a partir de IgG2 humana que se produce de manera natural, una región constante (SEQ ID NO: 3) originada a partir de IgG3 humana que se produce de manera natural o una región constante (SEQ ID NO: 4) originada a partir de IgG4 humana que se produce de manera natural puede usarse como región Fc de la presente invención. La región constante de IgG que se produce de manera natural también incluye variantes o similares derivadas de manera 40          espontánea a partir de la misma.

La región Fc de la presente invención es, de manera particularmente preferible, una región Fc que tiene actividad de unión reducida frente a un receptor de Fc<sub>γ</sub>. En este contexto, el receptor de Fc<sub>γ</sub> (también denominado Fc<sub>γ</sub>R en el 45          presente documento) se refiere a un receptor que puede unirse a la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y significa cualquier miembro de la familia de proteínas sustancialmente codificado por genes de receptor de Fc<sub>γ</sub>. En seres humanos, esta familia incluye, pero no se limita a: Fc<sub>γ</sub>RI (CD64) incluyendo las isoformas Fc<sub>γ</sub>RIa, Fc<sub>γ</sub>RIb, y Fc<sub>γ</sub>RIc; Fc<sub>γ</sub>RII (CD32) incluyendo las isoformas Fc<sub>γ</sub>RIIa (incluyendo los alotipos H131 (tipo H) y R131 (tipo R)), Fc<sub>γ</sub>RIIb (incluyendo Fc<sub>γ</sub>RIIb-1 y Fc<sub>γ</sub>RIIb-2), y Fc<sub>γ</sub>RIIc; y Fc<sub>γ</sub>RIII (CD16) incluyendo las isoformas Fc<sub>γ</sub>RIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y Fc<sub>γ</sub>RIIIb (incluyendo los alotipos Fc<sub>γ</sub>RIIIb-NA1 y Fc<sub>γ</sub>RIIIb-NA2); y cualquier Fc<sub>γ</sub>R humano o 50          alotipo o isoforma de Fc<sub>γ</sub>R aún por descubrir. Fc<sub>γ</sub>R incluye los derivados de seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Fc<sub>γ</sub>R no se limita a estas moléculas y puede derivarse de cualquier organismo. Los Fc<sub>γ</sub>R de ratón incluyen, pero no se limitan a, Fc<sub>γ</sub>RI (CD64), Fc<sub>γ</sub>RII (CD32), Fc<sub>γ</sub>RIII (CD16) y Fc<sub>γ</sub>RIII-2 (CD16-2), y cualquier Fc<sub>γ</sub>R de ratón o alotipo o isoforma de Fc<sub>γ</sub>R aún por descubrir. Los ejemplos preferidos de tales receptores de Fc<sub>γ</sub> incluyen Fc<sub>γ</sub>RI (CD64), Fc<sub>γ</sub>RIIa (CD32), Fc<sub>γ</sub>RIIb (CD32), Fc<sub>γ</sub>RIIIa (CD16) y/o Fc<sub>γ</sub>RIIIb (CD16) humanos.

55          Fc<sub>γ</sub>R se encuentra en las formas de un receptor activante que tiene ITAM (motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina) y un receptor inhibidor que tiene ITIM (motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina). Fc<sub>γ</sub>R se clasifica en Fc<sub>γ</sub>R activante (Fc<sub>γ</sub>RI, Fc<sub>γ</sub>RIIa R, Fc<sub>γ</sub>RIIa H, Fc<sub>γ</sub>RIIIa y Fc<sub>γ</sub>RIIIb) y Fc<sub>γ</sub>R inhibidor (Fc<sub>γ</sub>RIIb).

60          La secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc<sub>γ</sub>RI se describen en NM\_000566.3 y NP\_000557.1, respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc<sub>γ</sub>RIIa se describen en BC020823.1 y AAH20823.1, respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc<sub>γ</sub>RIIb se describen en BC146678.1 y AA146679.1, respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc<sub>γ</sub>RIIIa se describen en BC033678.1 y AAH33678.1, respectivamente; y la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de Fc<sub>γ</sub>RIIIb se describen en BC128562.1 y AA128563.1, respectivamente

(números de registro de RefSeq). Fc $\gamma$ RIIa tiene dos tipos de polimorfismos génicos que sustituyen el 131<sup>er</sup> aminoácido de Fc $\gamma$ RIIa por histidina (tipo H) o arginina (tipo R) (J. Exp. Med., 172, 19-25, 1990). Fc $\gamma$ RIIb tiene dos tipos de polimorfismos génicos que sustituyen el 232<sup>o</sup> aminoácido de Fc $\gamma$ RIIb por isoleucina (tipo I) o treonina (tipo T) (Arthritis. Rheum. 46: 1242-1254 (2002)). Fc $\gamma$ RIIIa tiene dos tipos de polimorfismos génicos que sustituyen el 158<sup>o</sup> aminoácido de Fc $\gamma$ RIIIa por valina (tipo V) o fenilalanina (tipo F) (J. Clin. Invest. 100 (5): 1059-1070 (1997)). Fc $\gamma$ RIIIb tiene dos tipos de polimorfismos génicos (tipo NA1 y tipo NA2) (J. Clin. Invest. 85: 1287-1295 (1990)).

La actividad de unión reducida frente a un receptor de Fc $\gamma$  puede confirmarse mediante un método bien conocido tal como FACS, formato de ELISA, ALPHAScreen (selección por ensayo homogéneo de proximidad luminescente amplificado) o el método BIACORE basado en un fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010).

El método ALPHAScreen se lleva a cabo mediante la tecnología ALPHA usando dos tipos de perlas (donadora y aceptora) basándose en el siguiente principio: se detectan señales de luminiscencia únicamente cuando estas dos perlas están ubicadas en proximidad mediante la interacción biológica entre una molécula unida con la perla donadora y una molécula unida con la perla aceptora. Un fotosensibilizador excitado por láser en la perla donadora convierte oxígeno ambiental en oxígeno singlete que tiene un estado excitado. El oxígeno singlete se difunde alrededor de la perla donadora y alcanza la perla aceptora ubicada en proximidad a la misma provocando de ese modo una reacción quimioluminiscente en la perla, que finalmente emite luz. En ausencia de la interacción entre la molécula unida con la perla donadora y la molécula unida con la perla aceptora, el oxígeno singlete producido por la perla donadora no alcanza la perla aceptora. Por tanto, no se produce ninguna reacción quimioluminiscente.

Por ejemplo, se deja que una molécula de unión a antígeno marcada con biotina se una a la perla donadora, mientras que se deja que un receptor de Fc $\gamma$  marcado con glutatión S transferasa (GST) se una a la perla aceptora. En ausencia de una molécula de unión a antígeno competidora que tiene una región Fc mutada, una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc de tipo natural interacciona con el receptor de Fc $\gamma$  para generar señales de 520 a 620 nm. La molécula de unión a antígeno no marcada que tiene una región Fc mutada compite con la molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc de tipo natural por la interacción con el receptor de Fc $\gamma$ . La reducción de la fluorescencia provocada como resultado de la competición puede cuantificarse para determinar de ese modo la afinidad de unión relativa. La biotinilación de molécula de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) usando sulfo-NHS-biotina o similar se conoce en la técnica. El receptor de Fc $\gamma$  puede marcarse con GST mediante un método adoptado de manera apropiada que implica, por ejemplo: fusionar un polinucleótido que codifica para el receptor de Fc $\gamma$  en marco con un polinucleótido que codifica para GST; y dejar que el gen de fusión resultante se exprese por células o similares que albergan vectores que pueden realizar la expresión del mismo, seguido por purificación usando una columna de glutatión. Las señales obtenidas se analizan preferiblemente usando, por ejemplo, software GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego) adaptado para un modelo de competición de un sitio basándose en análisis de regresión no lineal.

Una (ligando) de las sustancias entre las que tiene que observarse la interacción se inmoviliza sobre una película de oro delgada de un chip de sensor. Se irradia el chip de sensor con luz desde la parte trasera de tal manera que se produce reflexión total en la superficie de contacto entre la película de oro delgada y vidrio. Como resultado, se forma un sitio que tiene una caída de intensidad de reflexión (señal de SPR) en una porción de luz reflejada. La otra (analito) de las sustancias entre las que tiene que observarse la interacción se inyecta sobre la superficie del chip de sensor. Con la unión del analito al ligando, se aumenta la masa de la molécula de ligando inmovilizada cambiando el índice de refracción del disolvente en la superficie de chip de sensor. Este cambio en el índice de refracción desplaza la posición de la señal de SPR (por el contrario, la disociación de las moléculas unidas devuelve la señal a la posición original). El sistema Biacore traza en las ordenadas la cantidad del desplazamiento, es decir, cambio en masa en la superficie de chip de sensor, y presenta un cambio de masa dependiente del tiempo como datos de ensayo (sensograma). La cinética, es decir, una constante de tasa de asociación (ka) y una constante de tasa de disociación (kd), pueden determinarse a partir de la curva del sensograma, mientras que la afinidad (KD) puede determinarse a partir de la razón entre estas constantes. El ensayo de inhibición también se usa preferiblemente en el método BIACORE. Se describen ejemplos del ensayo de inhibición en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010.

En la presente memoria descriptiva, la actividad de unión reducida frente a un receptor de Fc $\gamma$  significa que la molécula de unión a antígeno que va a someterse a prueba muestra una actividad de unión de, por ejemplo, el 50 % o menos, preferiblemente el 45 % o menos, el 40 % o menos, el 35 % o menos, el 30 % o menos, el 20 % o menos, o el 15 % o menos, de manera particularmente preferible del 10 % o menos, el 9 % o menos, el 8 % o menos, el 7 % o menos, el 6 % o menos, el 5 % o menos, el 4 % o menos, el 3 % o menos, el 2 % o menos, o el 1 % o menos, en comparación con la actividad de unión de una molécula de unión a antígeno de control que comprende una región Fc basándose en el método de análisis descrito anteriormente.

Una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc de anticuerpo monoclonal de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 puede usarse de manera apropiada como molécula de unión a antígeno de control. La estructura de la región Fc se describe en SEQ ID NO: 1 (n.<sup>o</sup> de registro de RefSeq AAC82527.1 con A añadida al extremo N-terminal), SEQ ID NO: 2 (n.<sup>o</sup> de registro de RefSeq AAB59393.1 con A añadida al extremo N-terminal), SEQ ID NO: 3 (n.<sup>o</sup> de registro de

RefSeq CAA27268.1 con A añadida al extremo N-terminal) o SEQ ID NO: 4 (n.º de registro de RefSeq AAB59394.1 con A añadida al extremo N-terminal). En el caso de usar una molécula de unión a antígeno que tiene una variante de la región Fc de un anticuerpo de un determinado isotipo como sustancia de prueba, se usa una molécula de unión a antígeno que tiene la región Fc del anticuerpo de este determinado isotipo como control para someter a prueba el efecto de la mutación en la variante sobre la actividad de unión frente a un receptor de Fcγ. Se prepara de manera apropiada la molécula de unión a antígeno que tiene la variante de región Fc que se confirma de este modo que tiene actividad de unión reducida frente a un receptor de Fcγ.

Por ejemplo, como variante de este tipo se conoce en la técnica una variante de delección de 231A-238S (documento WO 2009/011941), C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol (2007) 34, 11), C226S, C229S (Hum. Antibod. Hybridomas (1990) 1 (1), 47-54), C226S, C229S, E233P, L234V o L235A (Blood (2007) 109, 1185-1192) (estos aminoácidos se definen según la numeración de EU).

Los ejemplos preferidos de las mismas incluyen moléculas de unión a antígeno que tienen una región Fc derivada de la región Fc de un anticuerpo de un determinado isotipo mediante la sustitución de cualquiera de los siguientes aminoácidos constituyentes: aminoácidos en las posiciones 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 y 332 definidas según la numeración de EU. El isotipo del anticuerpo a partir del cual se origina la región Fc no está particularmente limitado, y puede usarse de manera apropiada una región Fc originada a partir de un anticuerpo monoclonal de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Se usa preferiblemente una región Fc originada a partir de un anticuerpo de IgG1 humana que se produce de manera natural.

Por ejemplo, también puede usarse de manera apropiada una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc derivada de una región Fc de anticuerpo de IgG1 mediante cualquiera de los siguientes grupos de sustituciones de los aminoácidos constituyentes (el número representa la posición de un residuo de aminoácido definida según la numeración de EU; el código de aminoácido de una letra posicionado antes del número representa un residuo de aminoácido antes de la sustitución; y el código de aminoácido de una letra posicionado después del número representa un residuo de aminoácido antes de la sustitución):

- 30 (a) L234F, L235E, y P331S,
- (b) C226S, C229S, y P238S,
- (c) C226S y C229S, y
- 35 (d) C226S, C229S, E233P, L234V, y L235A

o mediante la delección de una secuencia de aminoácidos a partir de las posiciones 231 a 238 definidas según la numeración de EU.

40 También puede usarse de manera apropiada una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc derivada a partir de una región Fc de anticuerpo de IgG2 mediante cualquiera de los siguientes grupos de sustituciones de los aminoácidos constituyentes (el número representa la posición de un residuo de aminoácido definida según la numeración de EU; el código de aminoácido de una letra posicionado antes del número representa un residuo de aminoácido antes de la sustitución; y el código de aminoácido de una letra posicionado después del número representa un residuo de aminoácido antes de la sustitución):

- 45 (e) H268Q, V309L, A330S, y P331S,
  - 50 (f) V234A,
  - (g) G237A,
  - (h) V234A y G237A,
  - 55 (i) A235E y G237A, y
  - (j) V234A, A235E, y G237A
- 60 definidas según la numeración de EU.

También puede usarse de manera apropiada una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc derivada a partir de una región Fc de anticuerpo de IgG3 mediante cualquiera de los siguientes grupos de sustituciones de los aminoácidos constituyentes (el número representa la posición de un residuo de aminoácido definida según la numeración de EU; el código de aminoácido de una letra posicionado antes del número representa un residuo de aminoácido antes de la sustitución; y el código de aminoácido de una letra posicionado después del número representa

un residuo de aminoácido antes de la sustitución):

(k) F241A,

5 (l) D265A, y

(m) V264A

definidas según la numeración de EU.

10 También puede usarse de manera apropiada una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc derivada a partir de una región Fc de anticuerpo de IgG4 mediante cualquiera de los siguientes grupos de sustituciones de los aminoácidos constituyentes (el número representa la posición de un residuo de aminoácido definida según la numeración de EU; el código de aminoácido de una letra posicionado antes del número representa un residuo de aminoácido antes de la sustitución; y el código de aminoácido de una letra posicionado después del número representa un residuo de aminoácido antes de la sustitución):

(n) L235A, G237A, y E318A,

20 (o) L235E, y

(p) F234A y L235A

definidas según la numeración de EU.

25 Otros ejemplos preferidos de las mismas incluyen moléculas de unión a antígeno que tienen una región Fc derivada a partir de la región Fc de un anticuerpo de IgG1 humana que se produce de manera natural mediante la sustitución de cualquiera de los siguientes aminoácidos constituyentes: aminoácidos en las posiciones 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 y 331 definidas según la numeración de EU, mediante un aminoácido en la posición de numeración de EU correspondiente en la región Fc del homólogo de IgG2 o IgG4.

30 Otros ejemplos preferidos de las mismas incluyen moléculas de unión a antígeno que tienen una región Fc derivada a partir de la región Fc de un anticuerpo de IgG1 humana que se produce de manera natural mediante la sustitución de uno cualquiera o más de los siguientes aminoácidos constituyentes: aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 definidas según la numeración de EU, por un aminoácido diferente. El tipo del aminoácido presente después de la sustitución no está particularmente limitado. Se prefiere particularmente una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc con uno cualquiera o más de los aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 sustituidos por alanina.

35 Otros ejemplos preferidos de las mismas incluyen moléculas de unión a antígeno que tienen una región Fc derivada a partir de una región Fc de anticuerpo de IgG1 mediante la sustitución del aminoácido constituyente en la posición 265 definida según la numeración de EU, mediante un aminoácido diferente. El tipo del aminoácido presente después de la sustitución no está particularmente limitado. Se prefiere particularmente una molécula de unión a antígeno que tiene una región Fc con un aminoácido en la posición 265 sustituido por alanina.

40 45 Una técnica de suprimir la asociación no intencionada entre cadenas H introduciendo repulsión de carga eléctrica en la superficie de contacto entre los segundos dominios constantes (CH2) o los terceros dominios constantes (CH3) de las cadenas H de anticuerpo (documento WO2006/106905) puede aplicarse a la asociación para el anticuerpo multiespecífico.

50 55 En la técnica de suprimir la asociación no intencionada entre cadenas H introduciendo repulsión de carga eléctrica en la superficie de contacto de CH2 o CH3, los ejemplos de residuos de aminoácido en contacto entre sí en la superficie de contacto entre los dominios constantes de cadena H pueden incluir un residuo en la posición de numeración de EU 356, un residuo en la posición de numeración de EU 439, un residuo en la posición de numeración de EU 357, un residuo en la posición de numeración de EU 370, un residuo en la posición de numeración de EU 399 y un residuo en la posición de numeración de EU 409 en un dominio CH3, y sus residuos que son pareja en otro dominio CH3.

60 65 Más específicamente, por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo que comprende dos dominios CH3 de cadena H como anticuerpo en el que de uno a tres pares de residuos de aminoácido seleccionados de los siguientes pares de residuos de aminoácido (1) a (3) en el primer dominio CH3 de cadena H portan la misma carga eléctrica: (1) residuos de aminoácido en las posiciones de numeración de EU 356 y 439 contenidas en el dominio CH3 de cadena H; (2) residuos de aminoácido en las posiciones de numeración de EU 357 y 370 contenidas en el dominio CH3 de cadena H; y (3) residuos de aminoácido en las posiciones de numeración de EU 399 y 409 contenidas en el dominio CH3 de cadena H.

65 El anticuerpo puede prepararse además como anticuerpo en el que de uno a tres pares de residuos de aminoácido se seleccionan de los pares de residuos de aminoácido (1) a (3) en el segundo dominio CH3 de cadena H diferente del

primer dominio CH3 de cadena H para corresponder a los pares de residuos de aminoácido (1) a (3) que portan la misma carga eléctrica en el primer dominio CH3 de cadena H y para portar una carga eléctrica opuesta con respecto a sus residuos de aminoácido correspondientes en el primer dominio CH3 de cadena H.

- 5 Cada residuo de aminoácido descrito en los pares (1) a (3) está ubicado cerca de su pareja en las cadenas H asociadas. Los expertos en la técnica pueden encontrar posiciones correspondientes a los residuos de aminoácido descritos en cada uno de los pares (1) a (3) en cuanto a los dominios CH3 de cadena H deseados o dominios constantes de cadena H mediante modelado de homología o similar usando software comercialmente disponible y pueden alterar de manera apropiada residuos de aminoácido en las posiciones.
- 10 En el anticuerpo descrito anteriormente, cada uno de los "residuos de aminoácido que portan carga eléctrica" se selecciona preferiblemente, por ejemplo, de residuos de aminoácido incluidos en cualquiera de los siguientes grupos (a) y (b):
- 15 (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y  
 (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).
- 20 En el anticuerpo descrito anteriormente, la expresión "que porta la misma carga eléctrica" significa que, por ejemplo, la totalidad de dos o más residuos de aminoácido son residuos de aminoácido incluidos en uno cualquiera de los grupos (a) y (b). La expresión "que porta carga eléctrica opuesta" significa que, por ejemplo, al menos un residuo de aminoácido de dos o más residuos de aminoácido puede ser un residuo de aminoácido incluido en uno cualquiera de los grupos (a) y (b), mientras que el/los residuo(s) de aminoácido restante(s) es/son residuo(s) de aminoácido incluido(s) en el otro grupo.
- 25 El anticuerpo puede tener el primer dominio CH3 de cadena H y el segundo dominio CH3 de cadena H reticulados mediante un enlace disulfuro.
- 30 El residuo de aminoácido que va a alterarse no se limita a los residuos de aminoácido en la región variable de anticuerpo o la región constante de anticuerpo anteriormente mencionadas. Los expertos en la técnica pueden encontrar residuos de aminoácido que constituyen la superficie de contacto en cuanto a una variante de polipéptido o un heteromultímero mediante modelado de homología o similar usando software comercialmente disponible y pueden alterar residuos de aminoácido en las posiciones para regular la asociación.
- 35 La asociación para el anticuerpo multiespecífico también puede llevarse a cabo mediante una técnica alternativa conocida en la técnica. Una cadena lateral de aminoácido presente en el dominio variable de una cadena H de anticuerpo se sustituye por una cadena lateral más grande (botón) y la cadena lateral de su aminoácido pareja presente en el dominio variable de la otra cadena H se sustituye por una cadena lateral más pequeña (ojal). El botón puede colocarse en el ojal para asociar de manera eficiente los polipéptidos de los dominios de Fc que difieren en cuanto a la secuencia de aminoácidos (documento WO1996/027011; Ridgway JB *et al.*, Protein Engineering (1996) 9, 617-621; y Merchant AM *et al.* Nature Biotechnology (1998) 16, 677- 681).
- 45 Además de esta técnica, puede usarse una técnica alternativa adicional conocida en la técnica para formar el anticuerpo multiespecífico. Se convierte una porción de CH3 de una cadena H de anticuerpo en su secuencia derivada de IgA homóloga, y se convierte su porción complementaria en CH3 de la otra cadena H en su secuencia derivada de IgA homóloga. El uso del dominio CH3 modificado por ingeniería sometido a intercambio de cadena resultante puede provocar una asociación eficiente entre los polipéptidos que difieren en cuanto a la secuencia mediante asociación de CH3 complementaria (Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010). Mediante el uso de esta técnica conocida en la técnica, también puede formarse de manera eficiente el anticuerpo multiespecífico de interés.
- 50 Alternativamente, el anticuerpo multiespecífico puede formarse, por ejemplo, mediante una técnica de preparación de anticuerpos usando asociación de anticuerpo CH1-CL y asociación de VH-VL tal como se describe en el documento WO2011/028952, una técnica de preparación de un anticuerpo biespecífico usando anticuerpos monoclonales preparados por separado (intercambio de ramas de Fab) tal como se describe en los documentos WO2008/119353 y WO2011/131746, una técnica de control de la asociación entre dominios CH3 de cadena pesada de anticuerpo tal como se describe en los documentos WO2012/058768 y WO2013/063702, una técnica de preparación de un anticuerpo biespecífico constituido por dos tipos de cadenas ligeras y un tipo de cadena pesada tal como se describe en el documento WO2012/023053, o una técnica de preparación de un anticuerpo biespecífico usando dos líneas celulares bacterianas que expresan, cada una, una semimolécula de anticuerpo que consiste en una cadena H y una cadena L tal como se describe en Christoph *et al.* (Nature Biotechnology, vol. 31, págs. 753-758 (2013)). Además de estas técnicas de asociación, también puede usarse la tecnología CrossMab, una técnica de asociación de cadenas ligeras heteromérica de asociar una cadena ligera que forma una región variable que se une a un primer epítopo y una cadena ligera que forma una región variable que se une a un segundo epítopo a una cadena pesada que forma la región variable que se une al primer epítopo y una cadena pesada que forma la región variable que se une al segundo epítopo, respectivamente (Scaefer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2011) 108, 11187-11192), para preparar una molécula de unión a antígeno multiespecífica o multiparatópica proporcionada en el presente documento.

Los ejemplos de la técnica de preparación de un anticuerpo biespecífico usando anticuerpos monoclonales preparados por separado pueden incluir un método que implica fomentar la heterodimerización de anticuerpos colocando anticuerpos monoclonales con un aminoácido particular sustituido en un dominio CH3 de cadena pesada en condiciones reductoras para obtener el anticuerpo biespecífico deseado. Los ejemplos del sitio de sustitución de aminoácido preferido para este método pueden incluir un residuo en la posición de numeración de EU 392 y un residuo en la posición de numeración de EU 397 en el dominio CH3. Además, el anticuerpo biespecífico también puede prepararse mediante uso de un anticuerpo en el que de uno a tres pares de residuos de aminoácido seleccionados de los siguientes pares de residuos de aminoácido (1) a (3) en el primer dominio CH3 de cadena H portan la misma carga eléctrica: (1) residuos de aminoácido en las posiciones de numeración de EU 356 y 439 contenidas en el dominio CH3 de cadena H; (2) residuos de aminoácido en las posiciones de numeración de EU 357 y 370 contenidas en el dominio CH3 de cadena H; y (3) residuos de aminoácido en las posiciones de numeración de EU 399 y 409 contenidas en el dominio CH3 de cadena H. El anticuerpo biespecífico también puede prepararse mediante uso del anticuerpo en el que de uno a tres pares de residuos de aminoácido se seleccionan de los pares de residuos de aminoácido (1) a (3) en el segundo dominio CH3 de cadena H diferente del primer dominio CH3 de cadena H para corresponder a los pares de residuos de aminoácido (1) a (3) que portan la misma carga eléctrica en el primer dominio CH3 de cadena H y para portar una carga eléctrica opuesta con respecto a sus residuos de aminoácido correspondientes en el primer dominio CH3 de cadena H.

Aunque el anticuerpo multiespecífico de interés no pueda formarse de manera eficiente, el anticuerpo de la presente invención puede obtenerse mediante la separación y purificación del anticuerpo multiespecífico de interés a partir de anticuerpos producidos. Por ejemplo, el método anteriormente notificado implica introducir sustitución de aminoácido en los dominios variables de dos tipos de cadenas H para conferir a los mismos una diferencia en el punto isoeléctrico de modo que dos tipos de homodímeros y el anticuerpo heterodimerizado de interés pueden purificarse por separado mediante cromatografía de intercambio iónico (documento WO2007114325). Se ha notificado un método usar proteína A para purificar un anticuerpo heterodimerizado que consiste en una cadena H de IgG2a de ratón que puede unirse a proteína A y una cadena H de IgG2b de rata que no puede unirse a proteína A como método para purificar el heterodímero (documentos WO98050431 y WO95033844). Alternativamente, residuos de aminoácido en las posiciones de numeración de EU 435 y 436 que constituyen el sitio de unión a proteína A de IgG pueden sustituirse por aminoácidos, tales como Tyr e His, que ofrecen la fuerza diferente de unión a proteína A, y la cadena H resultante se usa para cambiar la interacción de cada cadena H con proteína A. Como resultado, puede purificarse de manera eficiente tan solo el anticuerpo heterodimerizado mediante uso de una columna de proteína A.

Puede usarse una pluralidad de, por ejemplo, dos o más de estas técnicas en combinación. Además, estas técnicas pueden aplicarse de manera apropiada por separado a las dos cadenas H que van a asociarse. Basándose en, pero por separado de, la forma así alterada, la molécula de unión a antígeno de la presente invención puede prepararse como una molécula de unión a antígeno que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la misma.

La alteración de una secuencia de aminoácidos puede realizarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de estos métodos que pueden realizarse pueden incluir, pero no se limitan a, métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, y Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, y Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, y Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, y Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367; y Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492), mutagénesis por PCR y mutagénesis por casete.

La "molécula de unión a antígeno" puede ser un fragmento de anticuerpo que comprende tanto una cadena pesada como una cadena ligera que constituyen la "región variable de anticuerpo" de la presente invención en una única cadena de polipéptido, pero carece de una región constante. Un fragmento de anticuerpo de este tipo puede ser, por ejemplo, un diacuerdo (Db), un anticuerpo de cadena sencilla o sc(Fab')2.

Db es un dímero constituido por dos cadenas de polipéptido (por ejemplo, Bolliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); documento EP404.097; y documento WO93/11161). Estas cadenas de polipéptido están unidas a través de un ligador de tan solo, por ejemplo, aproximadamente 5 residuos, de tal manera que un dominio variable de cadena L (VL) y un dominio variable de cadena H (VH) en la misma cadena de polipéptido no pueden emparejarse entre sí.

Debido a este ligador corto, VL y VH codificados en la misma cadena de polipéptido no pueden formar un FV de cadena sencilla y, en vez de eso, se dimerizan con VH y VL, respectivamente, en otra cadena de polipéptido, para formar dos sitios de unión a antígeno.

Los ejemplos del anticuerpo de cadena sencilla incluyen sc(Fv)2. sc(Fv)2 es un anticuerpo de cadena sencilla que tiene una cadena constituida por cuatro dominios variables, es decir, dos VL y dos VH, unidos mediante ligadores tales como ligadores peptídicos (J Immunol. Methods (1999) 231 (1-2), 177-189). Estos dos VH y VL pueden derivarse de

anticuerpos monoclonales diferentes. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen sc(Fv)2 biespecífico, que reconoce dos tipos de epítopos presentes en el mismo antígeno, tal como se da a conocer en *Journal of Immunology* (1994) 152 (11), 5368-5374. sc(Fv)2 puede prepararse mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, sc(Fv)2 puede prepararse conectando dos scFv mediante un ligador tal como un ligador peptídico.

Los ejemplos de la configuración de los dominios de unión a antígeno que constituyen el sc(Fv)2 descrito en el presente documento incluyen un anticuerpo en el que dos VH y dos VL están alineados como VH, VL, VH y VL (es decir, [VH]-ligador-[VL]-ligador-[VH]-ligador-[VL]) en este orden empezando en el extremo N-terminal del polipéptido de cadena sencilla. El orden de dos VH y dos VL no está particularmente limitado a la configuración descrita anteriormente y puede ser cualquier de disposición. Los ejemplos del mismo también pueden incluir las siguientes disposiciones:

- [VL]-ligador-[VH]-ligador-[VH]-ligador-[VL],
- [VH]-ligador-[VL]-ligador-[VL]-ligador-[VH],
- [VH]-ligador-[VH]-ligador-[VL]-ligador-[VL],
- [VL]-ligador-[VL]-ligador-[VH]-ligador-[VH], y
- [VL]-ligador-[VH]-ligador-[VL]-ligador-[VH].

La forma molecular del sc(Fv)2 también se describe en detalle en el documento WO2006/132352. Basándose en la descripción en el mismo, los expertos en la técnica pueden preparar de manera apropiada el sc(Fv)2 deseado con el fin de preparar la molécula de unión a antígeno dada a conocer en la presente memoria descriptiva.

La molécula de unión a antígeno de la presente invención puede conjugarse con un polímero de soporte tal como PEG o un compuesto orgánico tal como un agente anticanceroso. Además, puede añadirse preferiblemente una cadena de azúcar a la molécula de unión a antígeno de la presente invención mediante la inserción de una secuencia de glicosilación con el fin de producir los efectos deseados.

Por ejemplo, un ligador peptídico arbitrario que puede introducirse mediante ingeniería genética, o un ligador de compuesto sintético (por ejemplo, un ligador dado a conocer en *Protein Engineering*, 9 (3), 299-305, 1996), puede usarse como ligador para unir los dominios variables de anticuerpo. En la presente invención, se prefiere un ligador peptídico. La longitud del ligador peptídico no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera apropiada por los expertos en la técnica según el propósito. La longitud es preferiblemente de 5 o más aminoácidos (el límite superior no está particularmente limitado y es habitualmente de 30 o menos aminoácidos, preferiblemente de 20 o menos aminoácidos), de manera particularmente preferible 15 aminoácidos. Cuando el sc(Fv)2 contiene tres ligadores peptídicos, todos estos ligadores peptídicos usados pueden tener las mismas longitudes o pueden tener longitudes diferentes.

Los ejemplos del ligador peptídico pueden incluir

- Ser,
- Gly-Ser,
- Gly-Gly-Ser,
- Ser-Gly-Gly,
- Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 5),
- Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6),
- Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7),
- Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8),
- Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 9),
- Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10),
- Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 11),
- Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 12),

(Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7))n, y

(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8))n,

en las que n es un número entero de 1 o mayor.

Sin embargo, la longitud o secuencia del ligador peptídico puede seleccionarse de manera apropiada por los expertos en la técnica según el propósito.

El ligador de compuesto sintético (agente de reticulación químico) es un agente de reticulación habitualmente usado en la reticulación de péptidos, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), ditriobis(propionato de succinimidilo) (DSP), ditriobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP), bis(succinato de succinimidilo) de etilenglicol (EGS), bis(succinato de sulfosuccinimidilo) de etilenglicol (sulfo-EGS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxicarboniloxy)etil]sulfona (BSOCOES) o bis[2-(sulfosuccinimidoxicarboniloxy)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de reticulación están comercialmente disponibles.

Habitualmente se necesitan tres ligadores para unir cuatro dominios variables de anticuerpo. Todos estos ligadores usados pueden ser los mismos ligadores o pueden ser ligadores diferentes.

El F(ab')<sub>2</sub> comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una región constante (dominios CH1 y una porción de dominios CH2) para formar el enlace disulfuro entre cadenas entre estas dos cadenas pesadas. El F(ab')<sub>2</sub> que constituye un polipéptido asociado dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede obtenerse preferiblemente mediante la digestión parcial, por ejemplo, de un anticuerpo monoclonal completo que tiene los dominios de unión a antígeno deseados con una enzima proteolítica tal como pepsina seguido por la retirada de un fragmento Fc adsorbido sobre una columna de proteína A. Una enzima proteolítica de este tipo no está particularmente limitada siempre que la enzima pueda de digerir un anticuerpo completo para formar de manera restrictiva F(ab')<sub>2</sub> en condiciones de reacción establecidas de manera apropiada (por ejemplo, pH) de la enzima. Los ejemplos de la misma pueden incluir pepsina y ficina.

La molécula de unión a antígeno de la presente invención puede contener además una alteración adicional además de la alteración de aminoácido mencionada anteriormente. La alteración adicional puede seleccionarse, por ejemplo, de sustitución, delección y modificación de aminoácido, y una combinación de las mismas.

Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno de la presente invención puede alterarse adicionalmente de manera arbitraria, sustancialmente sin cambiar las funciones previstas de la molécula. Una mutación de este tipo puede realizarse, por ejemplo, mediante la sustitución conservativa de residuos de aminoácido. Alternativamente, puede llevarse a cabo incluso una alteración para cambiar las funciones previstas de la molécula de unión a antígeno de la presente invención siempre que las funciones cambiadas mediante tal alteración se encuentren dentro del objeto de la presente invención.

La alteración de una secuencia de aminoácidos según la presente invención también incluye una modificación postraduccional. Específicamente, la modificación postraduccional puede referirse a la adición o delección de una cadena de azúcar. La molécula de unión a antígeno de la presente invención, por ejemplo, que tiene una región constante de tipo IgG1, puede tener un residuo de aminoácido modificado con cadena de azúcar en la posición de numeración de EU 297. La estructura de cadena de azúcar para su uso en la modificación no está limitada. En general, los anticuerpos expresados por células eucariotas implican modificación de cadena de azúcar en sus regiones constantes. Por tanto, los anticuerpos expresados por las siguientes células se modifican habitualmente con alguna cadena de azúcar: células productoras de anticuerpos de mamífero; y células eucariotas transformadas con vectores de expresión que comprenden ADN que codifican para anticuerpo.

En este contexto, las células eucariotas incluyen células de levadura y animales. Por ejemplo, células CHO o células HEK293H son células de animales típicas para su transformación con vectores de expresión que comprenden ADN que codifican para anticuerpo. Por otro lado, el anticuerpo de la presente invención también incluye anticuerpos que carecen de modificación de cadena de azúcar en la posición. Los anticuerpos que tienen regiones constantes sin modificación de cadena de azúcar pueden obtenerse mediante la expresión de genes que codifican para estos anticuerpos en células procariotas tales como *E. coli*.

La alteración adicional según la presente invención puede ser más específicamente, por ejemplo, la adición de ácido siálico a una cadena de azúcar en una región Fc (mAbs, septiembre-octubre de 2010; 2 (5): 519-27).

Cuando la molécula de unión a antígeno de la presente invención tiene una región Fc puede añadirse a la misma, por ejemplo, sustitución de aminoácido para mejorar la actividad de unión frente a FcRn (J Immunol., 1 de enero de 2006; 176 (1): 346-56; J Biol Chem., 18 de agosto de 2006; 281 (33): 23514-24; Int Immunol., diciembre de 2006; 18 (12): 1759-69; Nat Biotechnol., febrero de 2010; 28 (2): 157-9; documento WO2006/019447; documento WO2006/053301;

y documento WO2009/086320) o sustitución de aminoácido para mejorar la heterogeneidad o estabilidad de anticuerpo (documento WO2009/041613).

- 5 En la presente invención, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y también incluye cualquier anticuerpo tal como anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales completos), anticuerpos policlonales, variantes de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos químéricos y anticuerpos humanizados siempre que el anticuerpo muestre la actividad biológica deseada.
- 10 Los ejemplos del origen del anticuerpo de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan particularmente a, anticuerpos humanos, anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata y anticuerpos de conejo.
- 15 El anticuerpo puede prepararse mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante un método de hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975)) o un método de recombinación (patente estadounidense n.º 4.816.567). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos presentados en fago (Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581- 597 (1991)). Además, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de clones de células B individuales (*N. Biotechnol.* 28 (5): 253-457 (2011)).
- 20 Los anticuerpos humanizados también se denominan anticuerpos humanos reconformados. Específicamente, por ejemplo, en la técnica se conoce un anticuerpo humanizado que consiste en un anticuerpo humano con injerto de CDR de anticuerpo de animal no humano (por ejemplo, ratón). También se conocen enfoques de recombinación génica generales para obtener los anticuerpos humanizados. Específicamente, por ejemplo, en la técnica se conoce PCR de extensión por solapamiento como un método para injertar CDR de anticuerpo de ratón en FR humanas.
- 25 Pueden insertarse ADN que codifican para dominios variables de anticuerpo que comprenden, cada uno, tres CDR y cuatro FR unidas y ADN que codifican para dominios constantes de anticuerpo humano en vectores de expresión de tal manera que los ADN de dominio variable se fusionan en marco con los ADN de dominio constante para preparar vectores para la expresión de anticuerpos humanizados. Estos vectores que tienen los insertos se transfieren a 30 huéspedes para establecer células recombinantes. Después, se cultivan las células recombinantes para la expresión de los ADN que codifican para los anticuerpos humanizados para producir los anticuerpos humanizados en los cultivos de las células cultivadas (véase la publicación de patente europea n.º EP 239400 y la publicación internacional n.º WO1996/002576).
- 35 Si es necesario, puede(n) sustituirse residuo(s) de aminoácido de FR de tal manera que las CDR del anticuerpo humano reconformado forman un sitio de unión a antígeno apropiado. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de FR puede mutarse mediante la aplicación del método de PCR usado en el injerto de CDR de ratón en las FR humanas.
- 40 El anticuerpo humano deseado puede obtenerse mediante inmunización de ADN usando animales transgénicos que tienen todos los repertorios de genes de anticuerpo humano (véanse las publicaciones internacionales n.ºs WO1993/012227, WO1992/003918, WO1994/002602, WO1994/025585, WO1996/034096 y WO1996/033735) como animales inmunizados.
- 45 Además, también se conoce una técnica de obtención de anticuerpos humanos mediante cribado usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se expresa una región V de anticuerpo humano como anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en la superficie de fagos mediante un método de presentación en fagos. Puede seleccionarse un fago que expresa scFv de unión a antígeno. Puede analizarse el gen del fago seleccionado para determinar una secuencia de ADN que codifica para la región V del anticuerpo humano de unión a antígeno. Tras la determinación de la secuencia de ADN del scFv de unión a antígeno, puede fusionarse la secuencia de región V en marco con la secuencia 50 de la región C de anticuerpo humano deseada y después insertarse en vectores de expresión apropiados para preparar vectores de expresión. Los vectores de expresión se transfieren a las células de expresión preferidas indicadas anteriormente para la expresión de los genes que codifican para los anticuerpos humanos para obtener los anticuerpos humanos. Estos métodos ya se conocen en la técnica (véanse las publicaciones internacionales n.ºs WO1992/001047, WO1992/020791, WO1993/006213, WO1993/011236, WO1993/019172, WO1995/001438 y WO1995/015388).
- 55 Las regiones variables que constituyen el anticuerpo pueden ser regiones variables que reconocen un antígeno arbitrario.
- 60 En la presente memoria descriptiva, el "antígeno" no está particularmente limitado y puede ser cualquier. Los ejemplos del antígeno incluyen 17-IA, 4-1 BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, receptor de adenosina A1, A33, ACE, ACE-2, activina, activina A, activina AB, activina B, activina C, activina RIA, activina RIA ALK-2, activina RIB ALK-4, activina RIIA, activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, adresinas, adiponectina, ADP ribosil ciclase-1, aFGF, AGE, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alérgeno, alfa1-antiquimiotripsina, alfa1-antitripsina, alfa-sinucleína, antagonista de alfa-V/beta-1, aminina, amilina, amiloide beta, región variable de cadena pesada de inmunoglobulina amiloide, región variable de cadena ligera de inmunoglobulina amiloide,andrógeno, ANG, angiotensinógeno, ligando de angiopoyetina 2, anti-Id, antitrombina III,

ántrax, APAF-1, APE, APJ, apo A1, apo suero amiloide A, Apo-SAA, APP, APRIL, AR, ARC, ART, artemina, ASPARTIC, factor natriurético auricular, péptido natriurético auricular, péptidos natriuréticos auriculares A, péptidos natriuréticos auriculares B, péptidos natriuréticos auriculares C, integrina av/b3, Axl, B7-1, B7-2, B7-H, BACE, BACE-1, antígeno protector de *Bacillus anthracis*, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, beta-2-microglobulina, betalactamasa, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, estimulante de linfocitos B (BlyS), BMP, BMP-2 (BMP-2a), BMP-3 (osteogenina), BMP-4 (BMP-2b), BMP-5, BMP-6 (Vgr-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BMPR-II (BRK-3), BMPs, BOK, bombesina, factor neurotrófico derivado de huesos, hormona de crecimiento bovina, BPDE, BPDE-ADN, BRK-2, BTC, molécula de adhesión celular de linfocitos B, C10, inhibidor de C1, C1q, C3, C3a, C4, C5, C5a (complemento 5a), CA125, CAD-8, cadherina 3, calcitonina, cAMP, anhidrasa carbónica IX, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado con carcinoma, cardiotrofina 1, catepsina A, catepsina B, catepsina C/DPPI, catepsina D, catepsina E, catepsina H, catepsina L, catepsina O, catepsina S, catepsina V, catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1/I-309, CCL11/eotaxina, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL16/HCC-4, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL19/ELC, CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3-alfa, CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MPIF-1, CCL24/eotaxina-2, CCL25/TECK, CCL26/eotaxina-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CCL3/MIP-1-alfa, CCL3L1/LD-78-beta, CCL4/MIP-1-beta, CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/10/MTP-1-gamma, CCR, CCR1, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD10, CD105, CD11a, CD11b, CD11c, CD123, CD13, CD137, CD138, CD14, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD15, CD152, CD16, CD164, CD18, CD19, CD2, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD26, CD27L, CD28, CD29, CD3, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteínas p67), CD34, CD37, CD38, CD3E, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD49b, CD5, CD51, CD52, CD54, CD55, CD56, CD6, CD61, CD64, CD66e, CD7, CD70, CD74, CD8, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD105, CD158a, CEA, CEACAM5, CFTR, cGMP, receptor de CGRP, CINC, CKb8-1, claudina 18, CLC, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina de *Clostridium difficile*, toxina de *Clostridium perfringens*, c-Met, CMV, UL de CMV, CNTF, CNTN-1, factor de complemento 3 (C3), factor de complemento D, globulina de unión a corticosteroide, receptor de factor estimulante de colonias 1, COX, C-Ret, CRG-2, CRTH2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1/fractalquina, CX3CR1, CXCL, CXCL1/Gro-alfa, CXCL10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1-alfa/beta, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRAK, CXCL15/lungquina, CXCL16, CXCL16, CXCL2/Gro-beta, CXCL3/Gro-gamma, CXCL3, CXCL4/PF4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, cistatina C, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor de aceleración del decaimiento, ligando 4 de proteína de tipo delta, des(1-3)IGF-1 (IGF-1 de cerebro), Dhh, DHICA oxidasa, Dickkopf-1, digoxina, dipeptidil peptidasa IV, DK1, DNAM-1, ADNasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), proteína que contiene dominio de tipo EGF 7, elastasa, elastina, EMA, EMMPRIN, ENA, ENA-78, endosialina, receptor de endotelina, endotoxina, encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxina, eotaxina 2, eotaxinas, EpCAM, efrina B2/EphB4, receptor de tirosina cinasa EphA2, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de ErbB2, receptor de tirosina cinasa ErbB3, ERCC, EREG, eritropoyetina (EPO), receptor de eritropoyetina, E-selectina, ET-1, éxodo 2, proteína F de VSR, F10, F11, F12, F13, F5, F9, factor Ia, factor IX, factor Xa, factor VII, factor VIII, factor VIIIc, Fas, FcalfaR, FcepsilonRI, Fcgammallb, FcgammaRI, FcgammaRIIa, FcgammaRIIIa, FcgammaRIIIb, FcRn, FEN-1, ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, receptor de FGF-2, FGF-3, FGF-8, FGF ácido, FGF básico, FGFR, FGFR-3, fibrina, proteína de activación de fibroblastos (FAP), factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos 10, fibronectina, FL, FLIP, Flt-3, ligando de FLT3, receptor de folato, hormona estimulante del folículo (FSH), fractalquina (CX3C), cadena pesada libre, cadena ligera libre, FZD1, FZD10, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, G-CSF, receptor de G-CSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-15 (MIC-1), GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14/CDMP-1), GDF-6 (BMP-13/CDMP-2), GDF-7 (BMP-12/CDMP-3), GDF-8 (miostatina), GDF-9, GDNF, gelsolina, GFAP, GF-CSF, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GF-β1, glicoproteína de la envuelta de gH, GITR, glucagón, receptor de glucagón, receptor de péptido similar al glucagón 1, Glut 4, glutamato carboxipeptidasa II, receptores hormonales de glicoproteína, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), glipícano 3, GM-CSF, receptor de GM-CSF, gp130, gp140, gp72, CSF de granulocitos (G-CSF), GRO/MGSA, factor de liberación de hormona del crecimiento, GRO-β, GRO-γ, *H. pylori*, hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, HCC 1, glicoproteína de la envuelta gB de CMVH, UL de CMVH, factor de crecimiento hematopoyético (HGF), gp120 de Hep B, heparanasa, cofactor de heparina II, factor de crecimiento hepático, antígeno protector de *Bacillus anthracis*, glicoproteína E2 de virus de la hepatitis C, hepatitis E, hepcidina, Her1, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glicoproteína gB de virus del herpes simple (VHS), HGF, HGF A, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), proteínas de la envuelta de VIH tales como GP120, bucle V3 de gp 120 de MIB de VIH, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HMGB-1, HRG, Hrk, HSP47, Hsp90, glicoproteína gD de VHS, miosina cardíaca humana, citomegalovirus humano (CMVH), hormona del crecimiento humana (hGH), albúmina sérica humana, activador de plasminógeno de tipo tisular humano (t-PA), huntingtina, HVEM, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, IgA, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1, IGF-1R, IGF-2, IGFBP, IGFR, IL, IL-1, IL-10, receptores de IL-10, IL-11, receptores de IL-11, IL-12, receptores de IL-12, IL-13, receptores de IL-13, IL-15, receptores de IL-15, IL-16, receptores de IL-16, IL-17, receptores de IL-17, IL-18 (IGIF), receptores de IL-18, IL-1alfa, IL-1beta, receptores de IL-1, IL-2, receptores de IL-2, IL-20, receptores de IL-20, IL-21, receptores de IL-21, IL-23, receptores de IL-23, receptores de IL-2, IL-3, receptores de IL-3, IL-31, receptores de IL-31, receptores de IL-3, IL-4, receptores de IL-4, IL-5, receptores de IL-5, IL-6, receptores de IL-6, IL-7, receptores de IL-7, IL-8, receptores de IL-8, IL-9, receptores de IL-9, complejo inmunitario de inmunoglobulina, inmunoglobulinas, INF-alfa, receptores de INF-alfa, INF-beta, receptores de INF-beta, INF-gamma, receptores de INF-gamma, IFN tipo-I, receptor de IFN tipo-I, influenza, inhibina, inhibina α, inhibina β, iNOS, insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, factor de crecimiento de tipo insulina 1, factor de crecimiento de tipo

insulina 2, proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, integrina, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa-V/beta-3, integrina alfa-V/beta-6, integrina alfa4/beta7, integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa5/beta6, integrina alfa σ (alfaV), integrina alfa θ, integrina beta1, integrina beta2, integrina beta3 (GPIIb-IIIa), IP-10, I-TAC, JE, calicreína, calicreína 11, calicreína 12, calicreína 14, calicreína 15, calicreína 2, calicreína 5, calicreína 6, calicreína L1, calicreína L2, calicreína L3, calicreína L4, calistatina, KC, KDR, 5 factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de queratinocitos 2 (KGF-2), KGF, receptor de tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, ligando de kit (KL), kit tirosina cinasa, laminina 5, LAMP, LAPP (amilina, polipéptido amiloide de los islotes), LAP (TGF-1), péptido asociado con latencia, TGF-1 latente, bp1 de TGF-1 latente, LBP, LDGF, LDL, receptor de LDL, LECT2, Lefty, leptina, hormona leutinizante (LH), antígeno de Lewis-Y, antígeno 10 relacionado con Lewis-Y, LFA-1, LFA-3, receptores de LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, tensioactivo pulmonar, hormona leutinizante, linfofotactina, receptor de linfofotoxina beta, receptor de lisoesfingolípido, Mac-1, CSF de macrófagos (M-CSF), MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, maspina, MCAM, MCK-2, MCP, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-I (MCAF), M-CSF, MDC, MDC (67 aa), MDC (69 aa), megsina, Mer, familia de receptores de MET tirosina cinasa, metaloproteasas, glicoproteína de membrana OX2, 15 mesotelina, receptor de MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), proteína microbiana, MIF, MIG, MIP, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, proteína atrayente de monocitos, factor de inhibición de colonias de monocitos, péptido asociado a gonadotropina de ratón, MPIF, Mpo, MSK, MSP, MUC-16, MUC18, mucina (Mud), sustancia inhibidora mulleriana, Mug, MuSK, glicoproteína asociada a mielina, factor inhibidor de progenitor mieloide 20 1 (MPIF-I), NAIP, nanocuerpo, NAP, NAP-2, NCA 90, NCAD, N-cadherina, NCAM, neprilisina, molécula de adhesión de células neuronales, neroverpina, factor de crecimiento neuronal (NGF), neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 6, neuropilina 1, neurturina, NGF-beta, NGFR, NKG20, N-metionil-hormona del crecimiento humana, nNOS, NO, Nogo-A, receptor de Nogo, proteína no estructural de tipo 3 (NS3) de virus de la hepatitis C, NOS, Npn, NRG-3, NT, NT-3, NT-4, NTN, OB, OGG1, oncostatina M, OP-2, OPG, OPN, OSM, receptores de OSM, factores osteoinductores, 25 osteopontina, OX40L, OX40R, LDL oxidado, p150, p95, PADPr, hormona paratiroides, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-cadherina, PCNA, PCSK9, PDGF, receptor de PDGF, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-D, PDK-1, PECAM, PEDF, PEM, PF-4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PGF, PIN, PLA2, factor de crecimiento placentario, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), lactógeno placentario, inhibidor del activador de plasminógeno 1, factor de crecimiento de plaquetas, plgR, PLP, cadenas de poliglicol de diferente tamaño (por ejemplo PEG-20, PEG-30, PEG40), PP14, 30 precalcireína, proteína del prion, procalcitonina, proteína de muerte celular programada 1, proinsulina, prolactina, proproteína convertasa PC9, prorelaxina, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), proteína A, proteína C, proteína D, proteína S, proteína Z, PS, PSA, PSCA, PsmAr, PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, ligando 1 de glicoproteína de P-selectina, R51, RAGE, RANK, RANKL, RANTES, relaxina, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, renina, F de virus sincitial respiratorio (VSR), Ret, reticulón 4, factores reumatoideos, RLI P76, RPA2, RPK-1, 35 RSK, Fgp de VSR, S100, RON-8, SCF/KL, SCGF, esclerostina, SDF-1, SDF1α, SDF1β, serina, amiloide sérico P, albúmina sérica, sFRP-3, Shh, toxina de tipo Shiga II, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, receptor 1 de 1-fosfato es esfingosina, ácido lipoteicoico de estafilococos, Stat, STEAP, STEAP-II, factor de células madre (SCF), estreptocinasa, superóxido dismutasa, sindecano 1, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína asociada a tumor 72), TARC, TB, TCA-3, receptor alfa/beta de células T, TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, 40 tenascina, TERT, fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, TfR, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta panespecífico, TGF-beta RII, TGF-beta RIIb, TGF-beta RIII, TGF-beta R1 (ALK-5), TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, TGF-I, trombina, trombopoyetina (TPO), receptor de linfofotínea estromal tímica, Ck-1 del timo, hormona estimulante de tiroides (TSH), tiroxina, globulina de unión a tiroxina, Tie, TIMP, TIQ, factor tisular, inhibidor de proteasa del factor tisular, proteína de factor tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, receptor de TNF I, receptor de TNF II, TNF-alfa, TNF-beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2/DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1/LIT/TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF12A, TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR/HveA/LIGHT R/TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ/TRADE), 45 50 TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF R1 CD120a/p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFSF10 (TRAIL ligando Apo-2/TL2), TNFSF1 55 (TRANCE/ligando RANK ODF/ligando OPG), TNFSF12 (TWEAK ligando Apo-3/ligando DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT ligando HVEM/LTg), TNFSF15 (TLIA/VEGI), TNFSF18 (ligando GITR ligando AITR/TL6), TNFSF1A (TNF-a conectina/DIF/TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa/TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC/p33), TNFSF4 (ligando OX40 gp34/TXGP1), TNFSF5 (ligando CD40 CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP), TNFSF6 (ligando Fas ligando Apo-1/ ligando APT1), TNFSF7 (ligando CD27 CD70), TNFSF8 (ligando CD30 CD153), TNFSF9 (ligando 4-1 BB ligando CD137), TNF-α, TNF-β, TNIL-I, metabolito tóxico, TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferrina, factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, glicoproteína transmembrana NMB, transtiretina, TRF, Trk, TROP-2, glicoproteína de trofoblastos, TSG, TSLP, factor de necrosis tumoral (TNF), antígeno asociado a tumor CA 125, antígeno asociado a tumor que expresa hidratos de carbono relacionados con Lewis Y, TWEAK, TXB2, 60 65 Ung, uPAR, uPAR-1, urocina, VAP-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vasrina, VCAM, VCAM-1,

5 VECAD, VE-cadherina, VE-cadherina-2, VEFGR-1 (flt-1), VEFGR-2, receptor de VEGF (VEGFR), VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos virales, receptor de VitB12, receptor de vitronectina, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina de VNR, factor de von Willebrand (vWF), WIF-1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, XCL1, XCL2/SCM-1-beta, XCL1/linfotactina, XCR1, XEDAR, XIAP y XPD.

10 Una de las dos regiones variables del anticuerpo incluidas en la molécula de unión a antígeno de la presente invención puede unirse a dos antígenos diferentes, pero no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo. El "primer antígeno" o el "segundo antígeno" a los que se une esta región variable es preferiblemente, por ejemplo, una molécula de superficie de inmunocitos (por ejemplo, una molécula de superficie de células T, una molécula de superficie de células NK, una molécula de superficie de células dendríticas, una molécula de superficie de células B, una molécula de superficie de células NKT, una molécula de superficie de células MDSC y una molécula de superficie de macrófagos), o un antígeno expresado no solo en células tumorales, vasos tumorales, células estromales y similares, sino también en tejidos normales (integrina, factor tisular, VEGFR, PDGFR, EGFR, IGFR, receptor de MET quimiocina, proteoglicano de heparan-sulfato, CD44, fibronectina, DRS, TNFRSF, etc.). En cuanto a la combinación del "primer antígeno" y el "segundo antígeno", preferiblemente, uno cualquiera del primer antígeno y el segundo antígeno es, por ejemplo, una molécula específicamente expresada en una célula T, y el otro antígeno es una molécula expresada en la superficie de una célula T o cualquier otro inmunocito. La combinación del "primer antígeno" y el "segundo antígeno", preferiblemente, uno cualquiera del primer antígeno y el segundo antígeno es, por ejemplo, una molécula 15 específicamente expresada en una célula T, y el otro antígeno es una molécula que se expresa en un inmunocito y es diferente del antígeno preliminarmente seleccionado. Los ejemplos específicos de la molécula específicamente expresada en una célula T incluyen CD3 y receptores de células T. Particularmente, se prefiere CD3. En el caso, por ejemplo, de CD3 humano, un sitio en el CD3 al que se une la molécula de unión a antígeno de la presente invención 20 puede ser cualquier epítopo presente en una secuencia de cadena  $\gamma$ , cadena  $\delta$  o cadena  $\epsilon$  que constituye el CD3 humano. Particularmente, se prefiere un epítopo presente en la región extracelular de una cadena  $\epsilon$  en un complejo de CD3 humano. Las secuencias de polinucleótido de las estructuras de cadena  $\gamma$ , cadena  $\delta$  y cadena  $\epsilon$  que constituyen CD3 se muestran en SEQ ID NO: 83 (NM\_000073.2), 85 (NM\_000732.4) y 87 (NM\_000733.3), y las secuencias de polipéptido de las mismas se muestran en SEQ ID NO: 84 (NP\_000064.1), 86 (NP\_000723.1) y 88 (NP\_000724.1) (los números de registro de RefSeq se muestran dentro de los paréntesis). Los ejemplos del otro antígeno incluyen 25 receptores de Fc $\gamma$ , TLR, lectina, IgA, moléculas de punto de control inmunitario, moléculas de la superfamilia de TNF, moléculas de la superfamilia de TNFR y moléculas de receptor de NK.

30 De las dos regiones variables del anticuerpo incluidas en la molécula de unión a antígeno de la presente invención, la otra región variable se une a un "tercer antígeno" que es diferente del "primer antígeno" y el "segundo antígeno" mencionados anteriormente. El tercer antígeno es un antígeno específico de célula tumoral y también incluye un antígeno expresado en asociación con la alteración maligna de células así como una cadena de azúcar anómala que aparece en la superficie celular o una molécula de proteína durante la transformación maligna de células. Los ejemplos específicos del mismo incluyen receptor de ALK (receptor de pleiotrofina), pleiotrofina, antígeno de cáncer pancreático KS 1/4, antígeno de cáncer de ovarios (CA125), fosfato ácido prostático, antígeno específico de próstata (PSA), 35 antígeno asociado a melanoma p97, antígeno de melanoma gp75, antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno de glóbulo graso lácteo humano, antígeno asociado a tumor colorrectal (por ejemplo, CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 y LEA), antígeno de linfoma de Burkitt 38.13, CD19, antígeno de linfoma B humano CD20, CD33, antígeno específico de melanoma (por ejemplo, gangliósido GD2, gangliósido GD3, 40 gangliósido GM2 y gangliósido GM3), antígeno de trasplante específico de tumor (TSTA), antígeno T, antígeno tumoral inducido por virus (por ejemplo, antígenos de la envuelta de virus tumoral de ADN y virus tumoral de ARN), CEA de colon,  $\alpha$ -fetoproteína de antígeno oncofetal (por ejemplo, glicoproteína trofoblástica oncofetal 5T4 y antígeno tumoral de vejiga oncofetal), antígeno de diferenciación (por ejemplo, antígenos de cáncer de pulmón humanos L6 y L20), 45 antígeno de fibrosarcoma, antígeno asociado a leucemia de células T humano Gp37, glicoproteína del recién nacido, esfingolípido, antígeno de cáncer de mama (por ejemplo, EGFR (receptor de factor de crecimiento epitelial)), NY-BR-16, NY-BR-16 y antígeno HER2 (p185HER2), mucina epitelial polimórfica (PEM), antígeno de linfocitos humano maligno APO-1, antígeno de diferenciación tal como antígeno I encontrado en eritrocitos fetales, antígeno endodérmico primario I encontrado en eritrocitos de adulto, I (Ma) encontrado en embriones antes del trasplante o cáncer gástrico, 50 M18 encontrado en epitelio de glándulas mamarias, M39, SSEA-1 encontrado en células de médula ósea, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D156-22 encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), SCP-1 encontrado en cánceres de testículos y ovarios, C14 encontrado en cáncer de colon, F3 encontrado en cáncer de pulmón, AH6 55 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Ley encontrado en células cancerosas embrionarias, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E1 (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células cancerosas embrionarias, antígeno de cáncer gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) 60 encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinoma, CO-43 (grupo sanguíneo Leb), G49 encontrado en receptor de EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALeb/Ley) encontrado en cáncer de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucina de cáncer gástrico, T5A7 encontrado en células de médula ósea, R24 encontrado en melanoma, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, y M1:22:25:8 encontrado en células cancerosas embrionarias, SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en embriones de 4 células a 8 células, antígeno asociado a linfoma de células T cutáneo, antígeno MART-1, antígeno sialil-Tn (STn), antígeno de cáncer de colon NY-CO-45, antígeno de 65

- cáncer de pulmón NY-LU-12 variante A, antígeno de adenocarcinoma ART1, antígeno de cáncer de cerebro-testículos asociado a paraneoplasia (antígeno onconeural MA2 y antígeno neuronal paraneoplásico), antígeno ventral neurooncológico 2 (NOVA2), gen de antígeno cancerígeno de células sanguíneas 520, antígeno asociado a tumor CO-029, antígeno asociado a tumor MAGE-C1 (antígeno de cáncer/testículos CT7), MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP), 5 MAGE-B2 (DAM6), MAGE-2, MAGE-4a, MAGE-4b MAGE-X2, antígeno de cáncer-testículos (NY-EOS-1), YKL-40 y cualquier fragmento de estos polipéptidos, y estructuras modificadas de los mismos (grupos fosfato modificados, cadenas de azúcar, etc., anteriormente mencionados), EpCAM, EREG, CA19-9, CA15-3, sialil-SSEA-1 (SLX), HER2, PSMA, CEA y CLEC12A.
- 10 La molécula de unión a antígeno de la presente invención puede producirse mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede prepararse mediante un método facilitado a continuación, aunque el método para preparar el anticuerpo de la presente invención no se limita al mismo. En la técnica se conocen muchas combinaciones de células huésped y vectores de expresión para la preparación de anticuerpos mediante la transferencia de genes aislados que codifican para polipéptidos en huéspedes apropiados. 15 Todos estos sistemas de expresión pueden aplicarse al aislamiento de la molécula de unión a antígeno de la presente invención. En el caso de usar células eucariotas como células huésped, pueden usarse de manera apropiada células de animales, células vegetales o células de hongos. Específicamente, los ejemplos de las células de animales pueden incluir las siguientes células:
- 20 (1) células de mamífero tales como CHO (línea celular de ovario de hámster chino), COS (línea celular de riñón de mono), células de mieloma (Sp2/0, NSO, etc.), BHK (línea celular de riñón de cría de hámster), HEK293 (línea celular de riñón embrionario humano con ADN de adenovirus (Ad)5 sometido a cizallamiento), células PER.C6 (línea celular de retina embrionaria humana transformada con los genes E1A y E1B de adenovirus de tipo 5 (Ad5)), Hela y Vero (Current Protocols in Protein Science (mayo de 2001, unidad 5.9, tabla 5.9.1)); 25
- (2) células de anfibio tales como ovocitos de *Xenopus*; y
- (3) células de insecto tales como sf9, sf21 y Tn5.
- 30 El anticuerpo también puede prepararse usando *E. coli* (mAbs, mayo-abril de 2012; 4 (2): 217-225) o levadura (documento WO2000023579). El anticuerpo preparado usando *E. coli* no está glicosilado. Por otro lado, el anticuerpo preparado usando levadura está glicosilado.
- 35 Se expresan un ADN que codifica para cadena pesada de anticuerpo que codifica para una cadena pesada con uno o más residuos de aminoácido en un dominio variable sustituidos por diferentes aminoácidos de interés, y un ADN que codifica para una cadena ligera del anticuerpo. El ADN que codifica para una cadena pesada o una cadena ligera con uno o más residuos de aminoácido en un dominio variable sustituidos por diferentes aminoácidos de interés puede obtenerse, por ejemplo, obteniendo un ADN que codifica para un dominio variable de anticuerpo preparado mediante un método conocido en la técnica frente a un determinado antígeno, e introduciendo de manera apropiada una 40 sustitución de tal manera que codones que codifican para los aminoácidos particulares en el dominio codifican para los diferentes aminoácidos de interés.
- 45 Alternativamente, puede diseñarse por adelantado un ADN que codifica para una proteína en la que uno o más residuos de aminoácido en un dominio variable de anticuerpo preparado mediante un método conocido en la técnica frente a un determinado antígeno están sustituidos por diferentes aminoácidos de interés y sintetizarse químicamente para obtener el ADN que codifica para una cadena pesada con uno o más residuos de aminoácido en un dominio variable sustituidos por diferentes aminoácidos de interés. El sitio de sustitución de aminoácido y el tipo de la sustitución no están particularmente limitados. Los ejemplos de la región preferida para la alteración de aminoácido incluyen regiones expuestas a disolvente y bucles en la región variable. Entre otros, se prefieren CDR1, CDR2, CDR3, 50 FR3 y bucles. Específicamente, se prefieren las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en el dominio variable de cadena L. Se prefieren más las posiciones de numeración de Kabat 31, de 52 a 61, de 71 a 74 y de 97 a 101 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 51 a 56 y de 89 a 96 en el dominio variable de cadena L.
- 55 La alteración de aminoácido no se limita a la sustitución y puede ser delección, adición, inserción o modificación, o una combinación de las mismas.
- 60 El ADN que codifica para una cadena pesada con uno o más residuos de aminoácido en un dominio variable sustituidos por diferentes aminoácidos de interés también puede producirse como ADN parciales independientes. Los ejemplos de la combinación de los ADN parciales incluyen, pero no se limitan a: un ADN que codifica para un dominio variable y un ADN que codifica para un dominio constante; y un ADN que codifica para un dominio de Fab y un ADN que codifica para un dominio de Fc. Asimismo, el ADN que codifica para cadena ligera también puede producirse como ADN parciales independientes.
- 65 Estos ADN pueden expresarse mediante el siguiente método: por ejemplo, se integra un ADN que codifica para un

- dominio variable de cadena pesada, junto con un ADN que codifica para un dominio constante de cadena pesada, en un vector de expresión para construir un vector de expresión de cadena pesada. Asimismo, se integra un ADN que codifica para un dominio variable de cadena ligera, junto con un ADN que codifica para un dominio constante de cadena ligera, en un vector de expresión para construir un vector de expresión de cadena ligera. Estos genes de cadena pesada y cadena ligera pueden integrarse en un único vector.
- El ADN que codifica para el anticuerpo de interés se integra en vectores de expresión para expresarse bajo el control de regiones de control de la expresión, por ejemplo, un potenciador y un promotor. A continuación, se transforman células huésped con los vectores de expresión resultantes y se dejan expresar anticuerpos. En este caso, pueden usarse huéspedes y vectores de expresión apropiados en combinación.
- Los ejemplos de los vectores incluyen vectores de la serie M13, vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript y pCR-Script. Además de estos vectores, por ejemplo, también puede usarse pGEM-T, pDIRECT o pT7 con el fin de subclonación y escisión de ADNc.
- Particularmente, los vectores de expresión son útiles para usar los vectores con el fin de producir el anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, cuando el huésped es *E. coli* tal como JM109, DH5α, HB101 o XL1-Blue, los vectores de expresión tienen de manera indispensable un promotor que permite la expresión eficiente en *E. coli*, por ejemplo, promotor lacZ (Ward *et al.*, *Nature* (1989) 341, 544-546; y FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), promotor araB (Better *et al.*, *Science* (1988) 240, 1041-1043) o promotor T7. Los ejemplos de tales vectores incluyen los vectores mencionados anteriormente así como pGEX-5X-1 (fabricado por Pharmacia), "sistema QIAexpress" (fabricado por Qiagen N.V.), pEGFP y pET (en este caso, el huésped es preferiblemente BL21 que expresa ARN polimerasa de T7).
- Los vectores pueden contener una secuencia señal para la secreción de polipéptidos. En el caso de producción en el periplasma de *E. coli*, puede usarse la secuencia señal pelB (Lei, S. P. *et al.*, *J. Bacterial.* (1987) 169, 4397) como secuencia señal para la secreción de polipéptidos. Los vectores pueden transferirse a las células huésped mediante el uso, por ejemplo, de un método de Lipofectin, un método de fosfato de calcio o un método de DEAE-dextrano.
- Además de los vectores de expresión para *E. coli*, los ejemplos de los vectores para producir el polipéptido de la presente invención incluyen vectores de expresión derivados de mamífero (por ejemplo, pcDNA3 (fabricado por Invitrogen Corp.), pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. 1990, 18 (17), pág. 5322), pEF y pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, "sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac" (fabricado por GIBCO BRL), y pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (por ejemplo, pMH1 y pMH2), vectores de expresión derivados de virus de animales (por ejemplo, pHSV, pMV y pAdExLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZIPneo), vectores de expresión derivados de levadura (por ejemplo, "kit de expresión de Pichia" (fabricado por Invitrogen Corp.), pNV11 y SP-Q01), y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608 y pKTH50).
- Con el fin de expresión en células de animales tales como células CHO, células COS, células NIH3T3 o células HEK293, los vectores tienen de manera indispensable un promotor necesario para la expresión intracelular, por ejemplo, promotor de SV40 (Mulligan *et al.*, *Nature* (1979) 277, 108), promotor de MMTV-LTR, promotor de EF1 $\alpha$  (Mizushima *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322), promotor de CAG (*Gene* (1991) 108, 193) o promotor de CMV y, más preferiblemente, tienen un gen para seleccionar células transformadas (por ejemplo, un gen de resistencia a fármaco que puede funcionar como marcador mediante un fármaco (neomicina, G418, etc.)). Los ejemplos de los vectores que tienen tales propiedades incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13. Además, puede expresarse proteína EBNA1 conjuntamente con los mismos con el fin de aumentar el número de copias génicas. En este caso, se usan vectores que tienen un origen de replicación OriP (Biotechnol Bioeng., 20 de octubre de 2001; 75 (2): 197-203; y Biotechnol Bioeng., 20 de septiembre de 2005; 91 (6): 670-7).
- Un método a modo de ejemplo destinado a expresar de manera estable el gen y aumentar el número de copias génicas intracelulares implica transformar células CHO deficientes en cuanto a ruta de síntesis de ácido nucleico con vectores que tienen un gen de DHFR que sirve como complemento a la misma (por ejemplo, pCHOI) y usar metotrexato (MTX) en la amplificación génica. Un método a modo de ejemplo destinado a expresar de manera transitoria el gen implica usar células COS que tienen un gen de antígeno T de SV40 en sus cromosomas para transformar las células con vectores que tienen un origen de replicación de SV40 (pcD, etc.). También puede usarse un origen de replicación derivado de poliomavirus, adenovirus, virus del papiloma bovino (VPB) o similares. Con el fin de aumentar el número de copias génicas en el sistema de célula huésped, los vectores de expresión pueden contener un marcador selectivo tal como un gen de aminoglicósido fosfotransferasa (APH), un gen de timidina cinasa (TK), un gen de xantina guanina fosforribosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt) o un gen de dihidrofolato reductasa (dhfr).
- El anticuerpo puede recuperarse, por ejemplo, cultivando las células transformadas y después separando el anticuerpo a partir del interior de las células transformadas con molécula o a partir de la disolución de cultivo de las mismas. El anticuerpo puede separarse y purificarse usando de manera apropiada en combinación métodos tales como centrifugación, fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación por sales, ultrafiltración, C1q, FcRn, columnas de proteína A y proteína G, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel.

5 La técnica mencionada anteriormente, tal como la tecnología de botones en ojales (documento WO1996/027011; Ridgway JB *et al.*, Protein Engineering (1996) 9, 617-621; y Merchant AM *et al.*, Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681) o la técnica de suprimir la asociación no intencionada entre cadenas H mediante la introducción de repulsión de cargas eléctricas (documento WO2006/106905), pueden aplicarse a un método para preparar de manera eficiente el anticuerpo multiespecífico.

10 La presente invención proporciona además un método para producir la molécula de unión a antígeno de la presente invención y proporciona específicamente un método para producir una molécula de unión a antígeno que comprende: una región variable de anticuerpo que puede unirse a dos antígenos diferentes (primer antígeno y segundo antígeno), pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo (esta región variable se denomina primera 15 región variable); y una región variable que se une a un tercer antígeno diferente del primer antígeno y el segundo antígeno (esta región variable se denomina segunda región variable), comprendiendo el método la etapa de preparar una biblioteca de moléculas de unión a antígeno que contiene diversas secuencias de aminoácidos de la primera región variable.

Los ejemplos del mismo pueden incluir un método de producción que comprende las siguientes etapas:

20 (i) preparar una biblioteca de moléculas de unión a antígeno con al menos un aminoácido alterado en sus regiones variables de anticuerpo que se unen, cada una, al primer antígeno o al segundo antígeno, en el que las regiones variables alteradas difieren en al menos un aminoácido una de otra;

25 (ii) seleccionar, de la biblioteca preparada, una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable que tiene actividad de unión frente al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo;

30 (iii) cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica para la región variable de la molécula de unión a antígeno seleccionada en la etapa (ii), y un ácido nucleico que codifica para una región variable de una molécula de unión a antígeno que se une al tercer antígeno, para expresar una molécula de unión a antígeno que comprende la región variable de anticuerpo que puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo, y la región variable que se une al tercer antígeno; y

35 (iv) recuperar la molécula de unión a antígeno a partir de los cultivos de célula huésped.

35 En este método de producción, la etapa (ii) puede ser la siguiente etapa de selección:

(v) seleccionar, de la biblioteca preparada, una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable que tiene actividad de unión frente al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo.

40 Las moléculas de unión a antígeno usadas en la etapa (i) no están particularmente limitadas siempre que estas moléculas comprendan, cada una, una región variable de anticuerpo. Las moléculas de unión a antígeno pueden ser fragmentos de anticuerpo tales como Fv, Fab, o Fab' o pueden ser anticuerpos que contienen región Fc.

45 El aminoácido que va a alterarse se selecciona, por ejemplo, de aminoácidos cuya alteración no cancela la unión al antígeno, en la región variable de anticuerpo que se une al primer antígeno o al segundo antígeno.

Puede usarse una alteración de aminoácido sola o puede usarse una pluralidad de alteraciones de aminoácido en combinación.

50 En el caso de usar una pluralidad de alteraciones de aminoácido en combinación, el número de las alteraciones que van a combinarse no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de 2 o más y 30 o menos, preferiblemente 2 o más y 25 o menos, 2 o más y 22 o menos, 2 o más y 20 o menos, 2 o más y 15 o menos, 2 o más y 10 o menos, 2 o más y 5 o menos o 2 o más y 3 o menos.

55 La pluralidad de alteraciones de aminoácido que van a combinarse pueden añadirse únicamente al dominio variable de cadena pesada o al dominio variable de cadena ligera de anticuerpo o pueden estar distribuidas de manera apropiada tanto en el dominio variable de cadena pesada como en el dominio variable de cadena ligera.

60 Los ejemplos de la región preferida para la alteración de aminoácido en los métodos de la invención incluyen regiones expuestas a disolvente y bucles en la región variable. Entre otras, se prefieren CDR1, CDR2, CDR3, FR3 y bucles. Específicamente, se prefieren las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en el dominio variable de cadena L. Se prefieren más las posiciones de numeración de Kabat 31, de 52a a 61, de 71 a 74 y de 97 a 101 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 51 a 56 y de 89 a 96 en el dominio variable de cadena L.

- La alteración de un residuo de aminoácido también incluye: la alteración aleatoria de aminoácidos en la región mencionada anteriormente en la región variable de anticuerpo que se une al primer antígeno o al segundo antígeno; y la inserción de un péptido que se sabe anteriormente que tiene actividad de unión frente al antígeno deseado, a la 5  
región mencionada anteriormente. La molécula de unión a antígeno de la presente invención puede obtenerse seleccionando una región variable que puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo, de las moléculas de unión a antígeno así alteradas. Los ejemplos del péptido que se sabe anteriormente que tiene actividad de unión frente al antígeno deseado incluyen péptidos mostrados en la tabla 10  
1 anteriormente.
- Si la región variable puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo, y además, si la región variable puede unirse tanto al primer antígeno como al segundo antígeno al mismo tiempo cuando uno cualquiera del primer antígeno y el segundo antígeno reside en una célula y el otro antígeno existe por sí solo, ambos de los antígenos existen cada uno por sí solo, o ambos de los antígenos residen en la misma 15  
célula, pero no puede unirse a estos antígenos expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo, también puede confirmarse según el método mencionado anteriormente.
- La presente invención proporciona además un método para producir la molécula de unión a antígeno de la presente invención y proporciona específicamente un método para producir una molécula de unión a antígeno que comprende 20  
una región variable de anticuerpo que puede unirse a dos antígenos diferentes (primer antígeno y segundo antígeno), pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo (esta región variable se denomina primera región variable), comprendiendo el método la etapa de preparar una biblioteca de moléculas de unión a antígeno que contienen diversas secuencias de aminoácidos de la primera región variable.
- Los ejemplos del método para producir una molécula de unión a antígeno de este tipo pueden incluir un método de 25  
producción que comprende las siguientes etapas:
- (i) preparar una biblioteca de moléculas de unión a antígeno con al menos un aminoácido alterado en sus regiones variables de anticuerpo que se unen, cada una, al primer antígeno o al segundo antígeno, en el que las regiones 30  
variables alteradas difieren en al menos un aminoácido una de otra;
  - (ii) seleccionar, de la biblioteca preparada, una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable que tiene actividad de unión frente al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo;
  - (iii) cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica para la región variable de la molécula 35  
de unión a antígeno seleccionada en la etapa (ii), y un ácido nucleico que codifica para el tercer antígeno, para expresar una molécula de unión a antígeno que comprende la región variable de anticuerpo que puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo; y
  - (iv) recuperar la molécula de unión a antígeno a partir de los cultivos de célula huésped.
- Los ejemplos de la región preferida para la alteración de aminoácido incluyen un dominio variable de cadena pesada. Los ejemplos más preferidos de la misma incluyen regiones expuestas a disolvente y bucles en el dominio variable. 45  
Entre otras, se prefieren CDR1, CDR2, CDR3, FR3 y bucles. Específicamente, se prefieren las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en el dominio variable de cadena L. Se prefieren más las posiciones de numeración de Kabat 31, de 52a a 61, de 71 a 74 y de 97 a 101 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 51 a 56 y de 89 a 96 en el dominio variable de cadena L. 50  

En este método de producción, la etapa (ii) puede ser la siguiente etapa de selección:

  - (v) seleccionar, de la biblioteca preparada, una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable que tiene actividad de unión frente al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo.

Las moléculas de unión a antígeno usadas en la etapa (i) no están particularmente limitadas siempre que estas moléculas comprendan, cada una, una región variable de anticuerpo. Las moléculas de unión a antígeno pueden ser fragmentos de anticuerpo tales como Fv, Fab o Fab' o pueden ser anticuerpos que contienen región Fc. 60  

El aminoácido que va a alterarse se selecciona, por ejemplo, de aminoácidos cuya alteración no cancela la unión al antígeno, en la región variable de anticuerpo que se une al primer antígeno o al segundo antígeno.

En la presente invención, puede usarse una alteración de aminoácido sola o puede usarse una pluralidad de alteraciones de aminoácido en combinación.

- En el caso de usar una pluralidad de alteraciones de aminoácido en combinación, el número de las alteraciones que van a combinarse no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de 2 o más y 30 o menos, preferiblemente 2 o más y 25 o menos, 2 o más y 22 o menos, 2 o más y 20 o menos, 2 o más y 15 o menos, 2 o más y 10 o menos, 2 o más y 5 o menos o 2 o más y 3 o menos.
- La pluralidad de alteraciones de aminoácido que van a combinarse pueden añadirse únicamente o bien al dominio variable de cadena pesada o bien al dominio variable de cadena ligera de anticuerpo o pueden estar distribuidas de manera apropiada tanto en del dominio variable de cadena pesada como en el dominio variable de cadena ligera.
- La alteración de un residuo de aminoácido también incluye: la alteración aleatoria de aminoácidos en la región mencionada anteriormente en la región variable de anticuerpo que se une al primer antígeno o al segundo antígeno; y la inserción de un péptido que se sabe anteriormente que tiene actividad de unión frente al antígeno deseado, a la región mencionada anteriormente. La molécula de unión a antígeno de la presente invención puede obtenerse seleccionando una región variable que puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo, de las moléculas de unión a antígeno así alteradas. Los ejemplos del péptido que se sabe anteriormente que tiene actividad de unión frente al antígeno deseado incluyen péptidos mostrados en la tabla 1 anteriormente.
- Si la región variable puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo, y además, si la región variable puede unirse tanto al primer antígeno como al segundo antígeno al mismo tiempo cuando uno cualquiera del primer antígeno y el segundo antígeno reside en una célula y el otro antígeno existe por sí solo, ambos de los antígenos existen cada uno por sí solo, o ambos de los antígenos residen en la misma célula, pero no puede unirse a estos antígenos expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo, también puede confirmarse según el método mencionado anteriormente.
- La molécula de unión a antígeno producida mediante cualquiera de estos métodos de producción también está incluida en la presente invención.
- El tipo o alcance de la alteración de aminoácido introducida mediante el método de la presente invención no está particularmente limitado.
- En una realización no limitativa, los ejemplos de la biblioteca de la presente invención incluyen una biblioteca que consiste en moléculas de unión a antígeno que se unen a CD3 (en el caso de CD3 humano, cadena  $\gamma$ , cadena  $\delta$  o cadena  $\epsilon$  que constituyen el CD3 humano) seleccionado como primer antígeno, y un segundo antígeno que es Fc $\gamma$ R, TLR, lectina, IgA, una molécula de punto de control inmunitario, una molécula de la superfamilia de TNF, molécula de la superfamilia de TNFR.
- En la presente memoria descriptiva, la "biblioteca" se refiere a una pluralidad de moléculas de unión a antígeno o una pluralidad de polipéptidos de fusión que comprenden las moléculas de unión a antígeno, o ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican para estas secuencias. La pluralidad de moléculas de unión a antígeno o la pluralidad de polipéptidos de fusión que comprenden las moléculas de unión a antígeno, incluidos en la biblioteca, son moléculas de unión a antígeno que difieren en cuanto a la secuencia unas de otras, que no tienen secuencias individuales, o polipéptidos de fusión que comprenden las moléculas de unión a antígeno.
- En una realización de la presente invención, puede prepararse un polipéptido de fusión de la molécula de unión a antígeno de la presente invención y un polipéptido heterólogo. En una realización, el polipéptido de fusión puede comprender la molécula de unión a antígeno de la presente invención fusionada con al menos una porción de una proteína de la envuelta viral seleccionada del grupo que consiste, por ejemplo, en proteínas de la envuelta viral pIII, pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD y pVI, y variantes de las mismas.
- Se proporciona una biblioteca que consiste esencialmente en una pluralidad de polipéptidos de fusión que difieren en cuanto a la secuencia unos de otros, comprendiendo cada uno de los polipéptidos de fusión cualquiera de estas moléculas de unión a antígeno y un polipéptido heterólogo. Específicamente, se proporciona una biblioteca que consiste esencialmente en una pluralidad de polipéptidos de fusión que difieren en cuanto a la secuencia unos de otros, comprendiendo cada uno de los polipéptidos de fusión cualquiera de estas moléculas de unión a antígeno fusionadas con al menos una porción de una proteína de la envuelta viral seleccionada del grupo que consiste, por ejemplo, en proteínas de la envuelta viral pIII, pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD y pVI, y variantes de las mismas. La molécula de unión a antígeno de la presente invención puede comprender además un dominio de dimerización. En una realización, el dominio de dimerización puede estar ubicado entre el dominio variable de cadena pesada o de cadena ligera de anticuerpo y al menos una porción de la proteína de la envuelta viral. Este dominio de dimerización puede comprender al menos una secuencia de dimerización y/o una secuencia que comprende uno o más residuos de cisteína. Este dominio de dimerización puede estar preferiblemente unido al extremo C-terminal del dominio variable o dominio constante de cadena pesada. El dominio de dimerización puede adoptar diversas estructuras, dependiendo de si el dominio variable de anticuerpo se prepara como un componente de polipéptido de fusión con el componente de proteína de la envuelta viral (un codón de terminación ámbar tras el dominio de dimerización está ausente) o

dependiendo de si el dominio variable de anticuerpo se prepara de manera predominante sin comprender el componente de proteína de la envuelta viral (por ejemplo, está presente un codón de terminación ámbar tras el dominio de dimerización). Cuando el dominio variable de anticuerpo se prepara de manera predominante como polipéptido de fusión con el componente de proteína de la envuelta viral, se provoca una presentación bivalente mediante uno o más enlaces disulfuro y/o una única secuencia de dimerización.

El término "que difieren en cuanto a la secuencia unas de otras" en una pluralidad de moléculas de unión a antígeno que difieren en cuanto a la secuencia unas de otras tal como se describe en el presente documento significa que las moléculas de unión a antígeno individuales en la biblioteca tienen secuencias distintas. Específicamente, el número de las secuencias distintas en la biblioteca refleja el número de clones independientes que difieren en cuanto a las secuencias en la biblioteca y también puede denominarse "tamaño de biblioteca". El tamaño de biblioteca de una biblioteca de presentación en fagos habitual es de  $10^6$  a  $10^{12}$  y puede expandirse hasta  $10^{14}$  mediante la aplicación de una técnica conocida en la técnica tal como un método de presentación de ribosoma. Sin embargo, el número real de partículas de fago para su uso en la selección de cribado para la biblioteca de fagos es habitualmente de 10 a 10.000 veces mayor que el tamaño de biblioteca. Este múltiplo excesivo, también denominado "número de equivalentes de la biblioteca", representa que de 10 a 10.000 clones individuales pueden tener la misma secuencia de aminoácidos. Por consiguiente, el término "que difieren en cuanto a la secuencia unas de otras" descrito en la presente invención significa que las moléculas de unión a antígeno individuales en la biblioteca, excluyendo el número de equivalentes de la biblioteca, tienen secuencias distintas y, más específicamente, significa que la biblioteca tiene de  $10^6$  a  $10^{14}$ , preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{12}$ , más preferiblemente de  $10^8$  a  $10^{11}$ , de manera particularmente preferible de  $10^8$  a  $10^{10}$  moléculas de unión a antígeno que difieren en cuanto a la secuencia unas de otras.

El término "que consiste esencialmente en" en la biblioteca que consiste esencialmente en una pluralidad de moléculas de unión a antígeno tal como se describe en la presente invención refleja el número de moléculas de unión a antígeno que difieren en cuanto a la actividad de unión frente al primer y/o segundo antígeno, entre los clones independientes que difieren en cuanto a la secuencia en la biblioteca. Específicamente, la biblioteca tiene preferiblemente al menos  $10^4$  moléculas de unión a antígeno que muestran tal actividad de unión. Más preferiblemente, la biblioteca tiene al menos  $10^5$  moléculas de unión a antígeno que muestran tal actividad de unión. De manera adicionalmente preferible, se proporciona una biblioteca que tiene al menos  $10^6$  moléculas de unión a antígeno que muestran tal actividad de unión. De manera particularmente preferible, se proporciona una biblioteca que tiene al menos  $10^7$  moléculas de unión a antígeno que muestran tal actividad de unión. También preferiblemente, se proporciona una biblioteca que tiene al menos  $10^8$  moléculas de unión a antígeno que muestran tal actividad de unión. Dicho de otro modo, el término puede indicarse preferiblemente mediante la razón del número de las moléculas de unión a antígeno que difieren en cuanto a la actividad de unión frente al primer y/o segundo antígeno con respecto al número de los clones independientes que difieren en cuanto a la secuencia en la biblioteca. Específicamente, se proporciona una biblioteca que comprende moléculas de unión a antígeno que muestran tal actividad de unión a una razón del 0,1 % al 80 %, preferiblemente del 0,5 % al 60 %, más preferiblemente del 1 % al 40 %, de manera adicionalmente preferible del 2 % al 20 %, de manera particularmente preferible del 4 % al 10 % al número de los clones independientes que difieren en cuanto a la secuencia en la biblioteca. Los polipéptidos de fusión, moléculas de polinucleótido o vectores también pueden indicarse mediante el número de moléculas o la razón con respecto a todas las moléculas, como en el caso anterior. Asimismo, también pueden indicarse virus mediante el número de virus individuales o la razón con respecto a todos los individuos, como en el caso anterior.

La "presentación en fagos" tal como se describe en el presente documento se refiere a un enfoque mediante el cual se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión con al menos una porción de proteínas de la cubierta en la superficie de partícula de fagos, por ejemplo, fagos filamentosos. La presentación en fagos es útil porque puede examinarse de manera rápida y eficiente una gran biblioteca de variantes de proteínas aleatorizadas para detectar una secuencia que se une a un antígeno diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas en los fagos se ha usado para examinar millones de polipéptidos para detectar unos con propiedades de unión específicas. Se ha usado un método de presentación en fagos polivalentes para presentar pequeños péptidos aleatorios y pequeñas proteínas mediante fusión con gen III o gen VIII de fago filamento (Wells y Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol. (1992) 3, 355-362; y referencias citadas en el mismo). La presentación en fagos monovalente implica fusionar una biblioteca de proteínas o péptidos a gen III o una porción del mismo, y expresar proteínas de fusión a bajos niveles en presencia de proteína de gen III de tipo natural de modo que cada partícula de fago presenta una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los fagos monovalentes tienen un efecto de avidez inferior al de los fagos polivalentes y, por tanto, se examinan basándose en afinidad de ligando endógeno usando vectores de fagémidos, lo cual simplifica la manipulación de ADN (Lowman y Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology (1991) 3, 205-216).

El "fagémido" se refiere a un vector de plásmido que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, ColE1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. Puede usarse de manera apropiada un fagémido derivado de cualquier bacteriófago conocido en la técnica, por ejemplo, un bacteriófago filamento o un bacteriófago lambdaideo. Habitualmente, el plásmido también contiene un marcador selectivo para resistencia a antibióticos. Fragmentos de ADN clonados en estos vectores pueden crecer como plásmidos. Cuando células que albergan estos vectores presentan todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el patrón de replicación de plásmidos se desplaza a replicación en círculo rodante para formar copias de una cadena de ADN de plásmido y empaquetar

partículas de fago. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye un fagémido que comprende un gen de proteína de la cubierta de fago o un fragmento del mismo unido con un gen de polipéptido heterólogo mediante fusión génica de tal manera que el polipéptido heterólogo se presenta sobre la superficie de la partícula de fago.

5 El término "vector de fago" significa un bacteriófago replicativo de cadena doble que comprende un gen heterólogo y que puede replicarse. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación de fago y formación de partículas de fago. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentoso, por ejemplo, un fago M13, f<sub>1</sub>, fd, o Pf3 o un derivado de los mismos, o un fago lambdaideo, por ejemplo, lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, o cualquier otro fago o un derivado del mismo.

10 El término "oligonucleótido" se refiere a un polidesoxinucleótido de cadena sencilla o doble corto que se sintetiza químicamente mediante un método conocido en la técnica (por ejemplo, química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita usando un enfoque de fase sólida tal como un enfoque descrito en el documento EP266032; o un método mediante productos intermedios de H-fosfonato de desoxinucleótido descrito en Froehler *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* (1986) 14, 5399-5407). Otros métodos para la síntesis de oligonucleótido incluyen la reacción en cadena de la polimerasa descrita a continuación y otros métodos de autocebador y síntesis de oligonucleótidos sobre soportes sólidos. Todos estos métodos se describen en Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1989) 28, 716-734. Estos métodos se usan si se conoce la secuencia de ácido nucleico completa del gen o si está disponible una secuencia de ácido nucleico complementaria a la cadena codificante. Alternativamente, puede predecirse de manera apropiada una posible secuencia de ácido nucleico usando residuos conocidos y preferidos que codifican para cada residuo de aminoácido, si se conoce la secuencia de aminoácidos objetivo. El oligonucleótido puede purificarse usando geles de poliacrilamida o columnas de exclusión molecular o mediante precipitación.

15 20 25 Los términos "proteína de fusión" y "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos segmentos unidos de manera covalente entre sí. Estos segmentos en el polipéptido difieren en cuanto al carácter. Este carácter puede ser, por ejemplo, una propiedad biológica tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. Alternativamente, este carácter puede ser una propiedad química o física individual, por ejemplo, unión a un antígeno diana o catálisis de reacción. Estos dos segmentos pueden unirse o bien directamente a través de un único enlace peptídico o bien a través de un ligador peptídico que contiene uno o más residuos de aminoácido. Habitualmente, estos dos segmentos y el ligador están ubicados en el mismo marco de lectura. Preferiblemente, los dos segmentos del polipéptido se obtienen a partir de polipéptidos heterólogos o diferentes.

30 35 40 45 El término "proteína de la cubierta" se refiere a una proteína, al menos una porción de la cual está presente sobre la superficie de una partícula viral. Desde un punto de vista funcional, la proteína de la cubierta es una proteína arbitraria que se une a partículas virales en el transcurso de la construcción de virus en células huésped y permanece unida a las mismas hasta la infección viral de otras células huésped. La proteína de la cubierta puede ser una proteína de la cubierta principal o puede ser una proteína de la cubierta secundaria. La proteína de la cubierta secundaria es habitualmente una proteína de la cubierta presente en la cápside viral preferiblemente a al menos aproximadamente 5, más preferiblemente al menos aproximadamente 7, de manera adicionalmente preferible al menos aproximadamente 10 o más copias de proteína por virión. La proteína de la cubierta principal puede estar presente a decenas, cientos o miles de copias por virión. Los ejemplos de la proteína de la cubierta principal incluyen proteína p8 de fago filamentoso.

50 55 60 65 66 Los ejemplos de un método para preparar la biblioteca incluyen los siguientes 6 métodos:

1. un método que implica insertar un péptido (este término se usa para incluir un polipéptido y una proteína) que se une al segundo antígeno en moléculas de unión a antígeno que se unen, cada una, al primer antígeno;
2. un método que implica preparar una biblioteca de tal manera que aparecen diversos aminoácidos en posiciones que permiten la alteración para dar una longitud (extensión) más grande de bucles en moléculas de unión a antígeno, y obtener una molécula de unión a antígeno que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario a partir de la biblioteca usando la actividad de unión frente al antígeno como índice;
3. un método que implica identificar aminoácidos que conservan actividad de unión frente al primer antígeno mediante uso de un anticuerpo preparado mediante mutagénesis dirigida al sitio a partir de una molécula de unión a antígeno que se sabe anteriormente que se une al primer antígeno, y obtener una molécula de unión a antígeno que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario a partir de una biblioteca en la que aparecen los aminoácidos identificados usando la actividad de unión frente al antígeno como índice;
4. el método 3 que implica además preparar una biblioteca de anticuerpos de tal manera que aparecen diversos aminoácidos en posiciones que permiten la alteración para dar una longitud (extensión) más grande de bucles en moléculas de unión a antígeno, y obtener una molécula de unión a antígeno que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario a partir de la biblioteca usando la actividad de unión frente al antígeno como índice;
5. el método 1, 2, 3 o 4 que implica además alterar las moléculas de unión a antígeno de tal manera que aparecen

secuencias de glicosilación (por ejemplo, NxS y NxT en las que x es un aminoácido distinto de P) para añadir a las mismas cadenas de azúcar que se reconocen mediante receptores de cadena de azúcar (por ejemplo, se añaden cadenas de azúcar de tipo de alto contenido en manosa a las mismas y de ese modo se reconocen mediante receptores de alto contenido en manosa; se sabe que las cadenas de azúcar de tipo de alto contenido en manosa se obtienen mediante la adición de kifunensina en el momento de la expresión del anticuerpo (mAbs, julio-agosto de 2012; 4 (4): 475-87)); y

6. el método 1, 2, 3 o 4 que implica además añadir al mismo dominios que se unen, cada uno, al segundo antígeno mediante un enlace covalente mediante inserción de Cys, Lys o un aminoácido no natural a bucles o sitios que se encuentra que pueden alterarse para dar diversos aminoácidos o sustituyendo estos sitios con Cys, Lys o un aminoácido no natural (este método se tipifica mediante conjugados de anticuerpo-fármaco y es un método para la conjugación a Cys, Lys o un aminoácido no natural mediante un enlace covalente (mAbs 6: 1, 34-45; enero/febrero de 2014; documento WO2009/134891 A2; y Bioconjug Chem., 19 de febrero de 2014; 25 (2): 351-61)).

15 En estos 6 métodos de preparación de bibliotecas indicados anteriormente, el sitio de sustitución de aminoácido en cada molécula de unión a antígeno o el sitio de inserción de péptido en la molécula de unión a antígeno es preferiblemente un sitio en una región Fab o variable en la molécula de unión a antígeno. Los ejemplos de la región preferida incluyen regiones expuestas a disolvente y bucles en la región variable. Entre otras, se prefieren CDR1, CDR2, CDR3, FR3 y bucles. Específicamente, se prefieren las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en el dominio variable de cadena L. Se prefieren más las posiciones de numeración de Kabat 31, de 52a a 61, de 71 a 74 y de 97 a 101 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 51 a 56 y de 89 a 96 en el dominio variable de cadena L.

20 25 Los ejemplos del método 1 que implica insertar un péptido que se une al segundo antígeno en moléculas de unión a antígeno que se unen, cada una, al primer antígeno también pueden incluir un método de insertar G-CSF tal como se muestra a modo de ejemplo en Angew Chem Int Ed Engl., 5 de agosto de 2013; 52 (32): 8295-8. En otra realización, el péptido que va a insertarse puede obtenerse a partir de una biblioteca de presentación de péptidos. Alternativamente, puede usarse la totalidad o una porción de una proteína que se produce de manera natural.

30 35 Con el fin de identificar aminoácidos que conservan actividad de unión frente a un primer antígeno CD3 (en el caso de CD3 humano, cadena  $\gamma$ , cadena  $\delta$  o cadena  $\epsilon$  que constituyen el CD3 humano), por ejemplo, se preparan anticuerpos con una alteración de aminoácido mediante alteración de aminoácido en sitios que se supone que participan en la unión a antígeno, y pueden examinarse estos anticuerpos. La unión a CD3 de los anticuerpos con una alteración de aminoácido pueden evaluarse mediante un método seleccionado de manera apropiada generalmente conocido por los expertos en la técnica y puede determinarse, por ejemplo, mediante ELISA, FACS (clasificación celular activada por fluorescencia), ALPHAScreen (selección por ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado) o el método BIACORE basado en un fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR).

40 45 50 Con el fin de identificar los aminoácidos que conservan actividad de unión frente a CD3, pueden usarse resultados sobre las razones de las cantidades, por ejemplo, de diversas formas alteradas unidas con respecto a la cantidad del anticuerpo sin alterar correspondiente unido. Específicamente, cuando la cantidad del anticuerpo sin alterar correspondiente unido se define como X y la cantidad de la forma con un aminoácido alterado unida se define como Y, puede usarse un valor de Z (razón de cantidades unidas) = Y / X. Puede considerarse que la forma alterada conserva la unión con respecto al anticuerpo sin alterar correspondiente cuando Z (razón de cantidad unida) es 0,5 o más, 0,6 o más, 0,7 o más, 0,8 o más, o 0,9 o más, preferiblemente 0,8 o más. La biblioteca de anticuerpos puede prepararse de tal manera que aparecen tales aminoácidos que conservan la unión.

55 La ECM (matriz extracelular) es un constituyente extracelular y reside en diversos sitios *in vivo*. Por tanto, se sabe que un anticuerpo que se une fuertemente a ECM tiene una cinética peor en sangre (semivida más corta) (documento WO2012093704 A1). Por tanto, preferiblemente se seleccionan aminoácidos que no potencian la unión a ECM como aminoácidos que aparecen en la biblioteca de anticuerpos.

60 65 Con el fin de seleccionar los aminoácidos que no potencian la unión a ECM, se evalúa la unión a ECM, por ejemplo, según un método del ejemplo de referencia 2. El valor de unión a ECM (reacción de ECL) de cada forma alterada se divide entre el valor de unión a ECM de un anticuerpo MRA (cadena H: SEQ ID NO: 57, cadena L: SEQ ID NO: 58), y puede usarse el valor resultante. Puede adoptarse un valor eficaz hasta 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o 30 veces como este valor teniendo en cuenta el efecto de potenciar la unión a ECM mediante una pluralidad de alteraciones. Preferiblemente, puede adoptarse un valor eficaz hasta 10 veces para la biblioteca. La biblioteca de anticuerpos puede prepararse de tal manera que aparecen los aminoácidos así seleccionados.

En el caso de insertar, pero sin limitarse a, un péptido de 6 aminoácidos en CDR3, la unión a ECM se potencia si el bucle extendido de CDR3 es rico en aminoácidos que tienen una cadena lateral con carga positiva. Por tanto, se prefiere que no deban aparecer en el bucle tres o más aminoácidos que tienen una cadena lateral con carga positiva.

- En la biblioteca, puede insertarse un péptido para potenciar su diversidad en cada región variable. Los ejemplos de la 5  
región preferida para la inserción de péptido incluyen regiones expuestas a disolvente y bucles en la región variable. Entre otras, se prefieren CDR1, CDR2, CDR3, FR3 y bucles. Específicamente, se prefieren las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en el dominio variable de cadena H y las 10  
posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en el dominio variable de cadena L. Se prefieren más las posiciones de numeración de Kabat 31, de 52a a 61, de 71 a 74 y de 97 a 101 en el dominio variable de cadena H y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 51 a 56 y de 89 a 96 en el dominio variable de cadena L. Se prefiere adicionalmente una región de con las posiciones de numeración de Kabat 99 y 100 en el dominio variable de cadena H. Además, puede introducirse adicionalmente un aminoácido que aumenta la actividad de unión a antígeno en el momento de la alteración de aminoácido.
- En una realización no limitativa de la presente invención, los ejemplos de la longitud del péptido que va a insertarse incluyen de 1 a 3 aminoácidos, de 4 a 6 aminoácidos, de 7 a 9 aminoácidos, de 10 a 12 aminoácidos, de 13 a 15 aminoácidos, de 15 a 20 aminoácidos y de 21 a 25 aminoácidos. La longitud del péptido que va a insertarse es 15  
preferiblemente de 1 a 3 aminoácidos, de 4 a 6 aminoácidos o de 7 a 9 aminoácidos.
- El sitio de inserción y la longitud del péptido para potenciar la diversidad de la biblioteca pueden estudiarse preparando 20  
moléculas con inserción de péptido y evaluando la unión a CD3 de las moléculas. La unión a CD3 puede evaluarse mediante un método seleccionado de manera apropiada generalmente conocido por los expertos en la técnica y puede determinarse, por ejemplo, mediante ELISA, FACS (clasificación celular activada por fluorescencia), ALPHAScreen (selección por ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado) o el método BIACORE basado en un fenómeno de resonancia de plasmón superficial (SPR).
- En una realización no limitativa de la presente invención, una biblioteca de anticuerpos para obtener un anticuerpo 25  
que se une a CD3 y al segundo antígeno puede diseñarse de la siguiente manera:
- etapa 1: seleccionar aminoácidos que conservan la capacidad de unirse a CD3 (para garantizar el 80 % o más de la cantidad del anticuerpo sin alterar unido a CD3).
- La biblioteca para obtener un anticuerpo que se une a CD3 y al segundo antígeno puede prepararse, por ejemplo, de 30  
tal manera que aparecen los aminoácidos seleccionados en la etapa 1.
- En una realización no limitativa de la presente invención, la biblioteca de anticuerpos para obtener un anticuerpo que 35  
se une a CD3 y al segundo antígeno puede diseñarse de la siguiente manera:
- etapa 1: seleccionar aminoácidos que conservan la capacidad de unirse a CD3 (para garantizar el 80 % o más de la cantidad del anticuerpo sin alterar unido a CD3); y
- etapa 2: insertar un aminoácido entre las posiciones 99 y 100 (numeración de Kabat) en CDR3 de cadena H. 40  
La biblioteca para obtener un anticuerpo que se une a CD3 y al segundo antígeno puede prepararse con la diversidad de biblioteca potenciada, por ejemplo, mediante la etapa 1 así como inserción de aminoácido en el dominio de CDR3 en la etapa 2.
- En una realización no limitativa de la presente invención, la biblioteca de anticuerpos para obtener un anticuerpo que 45  
se une a CD3 y al segundo antígeno puede diseñarse de la siguiente manera:
- etapa 1: seleccionar aminoácidos que conservan la capacidad de unirse a CD3 (para garantizar el 80 % o más de la cantidad del anticuerpo sin alterar unido a CD3);
- etapa 2: seleccionar aminoácidos que conservan una unión a ECM dentro de 10 veces la de MRA en comparación 50  
con antes de la alteración;
- y etapa 3: insertar un aminoácido entre las posiciones 99 y 100 (numeración de Kabat) en CDR3 de cadena H.
- Los aminoácidos que no potencian la unión a ECM también pueden seleccionarse como aminoácidos que aparecen 55  
la biblioteca, por ejemplo, mediante las etapas 1 y 3 así como la etapa 2, aunque la presente invención no está limitada por este enfoque. Incluso el diseño de biblioteca sin la etapa 2 permite someter a ensayo una molécula de unión a antígeno obtenida a partir de la biblioteca y evaluarla para determinar la unión a ECM.
- En una realización no limitativa de la presente invención, puede usarse un CE115HA000 de dominio de VH (SEQ ID 60  
NO: 52) como secuencia de molde para anticuerpo de unión a CD3 (CD3 $\varepsilon$ ). En tal caso, los ejemplos de aminoácidos para su uso en el diseño de biblioteca pueden incluir uno cualquiera o más de los aminoácidos en las posiciones de numeración de Kabat 11, 31, 52a, 52b, 52c, 53, 54, 56, 57, 61, 72, 78, 98, 99, 100, 100a, 100b, 100c, 100d, 100e, 65  
100f, 100g y 101 contenidas en el dominio variable de cadena pesada.

Para la biblioteca, se prefiere introducir la alteración de aminoácido V11L/L78I en el CE115HA000 de dominio de VH (SEQ ID NO: 52), aunque la biblioteca según la presente invención no se limita a lo mismo. Para la biblioteca, se prefiere adicionalmente introducir la alteración de aminoácido V11L/D72A/L78I/D101Q en el CE115HA000 de dominio de VH (SEQ ID NO: 52), aunque la biblioteca según la presente invención no se limita a lo mismo.

5 En una realización no limitativa de la presente invención, puede usarse un GLS3000 de dominio de VL (SEQ ID NO: 53) como secuencia de molde para anticuerpo de unión a CD3 (CD3c). En tal caso, los ejemplos de aminoácidos para su uso en el diseño de biblioteca pueden incluir uno cualquiera o más de los aminoácidos en las posiciones de numeración de Kabat 24, 25, 26, 27, 27a, 27b, 27c, 27e, 30, 31, 33, 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 74, 77, 89, 90, 92, 93, 10 94, 96 y 107 contenidas en el dominio variable de cadena ligera.

15 El diseño de biblioteca según la presente invención incluye el, pero está particularmente limitado al, diseño de una biblioteca que comprende dominios de unión a antígeno con un aminoácido en un sitio particular alterado para dar el aminoácido deseado, o una pluralidad de formas alteradas de moléculas de unión a antígeno que comprenden dominios de unión a antígeno mediante el uso de una técnica de biblioteca conocida en la técnica, por ejemplo, biblioteca NNK o TRIM (Gonzalez-Munoz A *et al.*, mAbs 2012; Lee CV *et al.*, J Mol Biol. 2004; Knappik A *et al.*, J Mol Biol. 2000; y Tiller T *et al.*, mAbs 2013).

20 En la presente invención, el término "uno o más aminoácidos" no se limita a un número particular de aminoácidos y pueden ser 2 o más tipos de aminoácidos, 5 o más tipos de aminoácidos, 10 o más tipos de aminoácidos, 15 o más tipos de aminoácidos o 20 tipos de aminoácidos.

25 En cuanto a la presentación de polipéptidos de fusión, el polipéptido de fusión de la región variable de la molécula de unión a antígeno puede presentarse en diversas formas en la superficie de células, virus o partículas de fagémidos. Estas formas incluyen fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos F(ab) y formas multivalentes de estos fragmentos. Las formas multivalentes son preferiblemente dímeros de ScFv, Fab y F(ab'), que se denominan (ScFv)2, F(ab)2 y F(ab')2, respectivamente, en el presente documento. Se prefiere la presentación de las formas multivalentes, probablemente en parte porque las formas multivalentes presentadas permiten habitualmente la identificación de clones de baja afinidad y/o tienen una pluralidad de sitios de unión a antígeno que permiten una selección más eficiente de clones poco frecuentes en el transcurso de la selección.

30 35 En la técnica se conocen métodos para presentar polipéptidos de fusión que comprenden fragmentos de anticuerpo en la superficie de bacteriófagos y se describen, por ejemplo, en el documento WO1992001047 y la presente memoria descriptiva. Otros métodos relacionados se describen en los documentos WO1992020791, WO1993006213, WO1993011236 y 1993019172. Los expertos en la técnica pueden usar de manera apropiada estos métodos. Otros documentos de bibliografía públicos (H.R. Hoogenboom y G. Winter (1992) J. Mol. Biol. 227, 381-388, documento WO1993006213 y documento WO1993011236) dan a conocer la identificación de anticuerpos usando repertorios de genes de región variable reordenados de manera artificial frente a diversos抗igenos presentados en la superficie de fagos.

40 45 En el caso de construir un vector para presentación en forma de scFv, este vector comprende secuencias de ácido nucleico que codifican para el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada de la molécula de unión a antígeno. En general, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena pesada de la molécula de unión a antígeno se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica para un constituyente de proteína de la envuelta viral. La secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena ligera de la molécula de unión a antígeno se une al ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada de la molécula de unión a antígeno a través de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un ligador peptídico. Generalmente, el ligador peptídico contiene aproximadamente de 5 a 15 aminoácidos. Opcionalmente, puede fusionarse una secuencia adicional que codifica, por ejemplo, para una etiqueta útil en la purificación o detección, con el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena ligera de la molécula de unión a antígeno o la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena pesada de la molécula de unión a antígeno, o ambas.

50 55 60 65 En el caso de construir un vector para presentación en forma de F(ab), este vector comprende secuencias de ácido nucleico que codifican para los dominios variables de la molécula de unión a antígeno y los dominios constantes de la molécula de unión a antígeno. La secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena ligera se fusiona con la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio constante de cadena ligera. La secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable de cadena pesada de la molécula de unión a antígeno se fusiona con la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio CH1 constante de cadena pesada. En general, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio variable y dominio constante de cadena pesada se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica para la totalidad o una porción de una proteína de la envuelta viral. El dominio variable y dominio constante de cadena pesada se expresan preferiblemente como un producto de fusión con al menos una porción de la proteína de la envuelta viral, mientras que el dominio variable y dominio constante de cadena ligera se expresan por separado de la proteína de fusión de cadena pesada-envuelta viral. La cadena pesada y la cadena ligera pueden asociarse entre sí mediante un enlace covalente o un enlace no covalente. Opcionalmente, puede fusionarse una secuencia adicional que codifica, por ejemplo, para una etiqueta polipeptídica útil en la

purificación o detección, con el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio constante de cadena ligera de la molécula de unión a antígeno o la secuencia de ácido nucleico que codifica para el dominio constante de cadena pesada de la molécula de unión a antígeno, o ambas.

- 5 En cuanto a la transferencia de vector a células huésped, los vectores construidos tal como se describió anteriormente se transfieren a células huésped para su amplificación y/o expresión. Los vectores pueden transferirse a células huésped mediante un método de transformación conocido en la técnica, incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio y similares. Cuando los vectores son partículas infecciosas tales como virus, los propios vectores invaden las células huésped. Se presentan proteínas de fusión en la superficie de partículas de fago mediante la transfección de células huésped con vectores de expresión replicables que tienen insertos de polinucleótidos que codifican para las proteínas de fusión y la producción de las partículas de fago mediante un enfoque conocido en la técnica.
- 10 Los vectores de expresión replicables pueden transferirse a células huésped mediante el uso de diversos métodos. Los vectores pueden transferirse a las células mediante electroporación tal como se describe en el documento WO2000106717. Se cultivan las células a 37°C, opcionalmente durante aproximadamente de 6 a 48 horas (o hasta que la DO a 600 nm alcanza de 0,6 a 0,8) en un medio de cultivo convencional. A continuación, se centrifuga el medio de cultivo y se retira el sobrenadante de cultivo (por ejemplo, mediante decantación). En la fase inicial de purificación, preferiblemente se resuspende el sedimento celular en una disolución de tampón (por ejemplo, HEPES 1,0 mM (pH 7,4)). A continuación, se centrifuga de nuevo la suspensión para retirar el sobrenadante. Se resuspende el sedimento celular obtenido en glicerina diluida hasta, por ejemplo, del 5 al 20 % V/V. Se centrifuga de nuevo la suspensión para la retirada del sobrenadante para obtener sedimento celular. Se resuspende el sedimento celular en agua o glicerina diluida. Basándose en la densidad celular medida de la suspensión resultante, se ajusta la densidad celular final hasta una densidad deseada usando agua o glicerina diluida.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Los ejemplos de células receptoras preferidas incluyen una cepa SS320 de *E. coli* que puede responder a electroporación (Sidhu *et al.*, Methods Enzymol. (2000) 328, 333-363). La cepa SS320 de *E. coli* se ha preparado mediante el acoplamiento de células MC1061 con células XL1-BLUE en condiciones suficientes para transferir episoma de fertilidad (plásmido F') o XL1-BLUE en las células MC1061. La cepa SS320 de *E. coli* se ha depositado en la ATCC (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia) con el n.º de registro 98795. Cualquier episoma de F' que permita la replicación de fagos en esta cepa puede usarse en la presente invención. Puede obtenerse un episoma apropiado a partir de cepas depositadas en la ATCC o puede obtenerse como producto comercialmente disponible (TG1, CJ236, CSH18, DHF', ER2738, JM101, JM103, JM105, JM107, JM109, JM110, KS1000, XL1-BLUE, 71-18, etc.).
- El uso de concentraciones superiores de ADN (aproximadamente 10 veces) en electroporación mejora la frecuencia de transformación y aumenta la cantidad de ADN que transforman las células huésped. El uso de altas densidades celulares también mejora la eficiencia (aproximadamente 10 veces). La cantidad aumentada de ADN transferidos puede proporcionar una biblioteca que tiene una mayor diversidad y un mayor número de clones independientes que difieren en cuanto a la secuencia. Las células transformadas se seleccionan habitualmente basándose en la presencia o ausencia de crecimiento en un medio que contiene un antibiótico.
- Además, se proporciona un ácido nucleico que codifica para la molécula de unión a antígeno de la presente invención. El ácido nucleico puede estar en cualquier forma tal como ADN o ARN.
- También se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico tal como se proporciona en el presente documento. El tipo del vector puede seleccionarse de manera apropiada por los expertos en la técnica según las células huésped que reciben el vector. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de los vectores anteriormente mencionados.
- También se proporciona una célula huésped transformada con el vector tal como se proporciona en el presente documento. La célula huésped puede seleccionarse de manera apropiada por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de las células huésped anteriormente mencionadas.
- La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse según un método conocido en la técnica mediante suplementación de la molécula de unión a antígeno de la presente invención con el portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede usarse en forma de una inyección parenteral de una disolución o suspensión aséptica con agua o cualquier otra disolución farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse con la molécula de unión a antígeno mezclada en una forma de dosificación unitaria requerida para la práctica farmacéutica generalmente aceptada, en combinación apropiada con medios o portadores farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceite vegetal, un emulsionante, un agente de suspensión, un tensioactivo, un estabilizante, un agente aromatizante, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, etc. Los ejemplos específicos del portador pueden incluir ácido silícico anhídrico ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, caramelo de calcio, caramelo de sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, dietilaminoacetato de polivinil-acetal, polivinilpirrolidona, gelatina,

triglicérido de ácido graso de cadena media, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 60, sacárido, carboximetilcelulosa, almidón de maíz y sales inorgánicas. La cantidad del principio activo en una preparación de este tipo se determina de tal manera que puede lograrse una dosis apropiada dentro del intervalo recomendado.

5 Puede formularse una composición aséptica para inyección según la práctica farmacéutica convencional usando un vehículo tal como agua destilada inyectable. Los ejemplos de disoluciones acuosas para inyección incluyen solución salina fisiológica, disoluciones isotónicas que contienen glucosa y otros adyuvantes, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio. Estas disoluciones pueden usarse en combinación con un solubilizante apropiado, por ejemplo, un alcohol (específicamente, etanol) o un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol y polietilenglicol), o un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 80(TM) o HCO-50.

10 Los ejemplos de disoluciones aceitosas incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. Estas disoluciones pueden usarse en combinación con benzoato de bencilo o alcohol bencílico como solubilizante. Las disoluciones pueden mezclarse adicionalmente con un tampón (por ejemplo, una disolución de tampón de fosfato y una disolución de tampón de acetato de sodio), un agente calmante (por ejemplo, clorhidrato de procaína), un estabilizante (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y un antioxidante. Las disoluciones para inyección así preparadas se cargan habitualmente en ampollas apropiadas. La composición farmacéutica de la presente invención es preferiblemente para administrarse por vía parenteral. Los ejemplos específicos de sus formas de dosificación incluyen inyecciones, agentes de administración intranasal, agentes de administración transpulmonar y agentes de administración percutánea. Los ejemplos de las inyecciones incluyen inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea, mediante las cuales puede administrarse la composición farmacéutica de manera sistémica o local.

15 20 25 30 El método de administración puede seleccionarse de manera apropiada dependiendo de la edad y los síntomas de un paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene un polipéptido o un polinucleótido que codifica para el polipéptido puede seleccionarse dentro de un intervalo de, por ejemplo, 0,0001 a 1000 mg/kg de peso corporal por dosis. Alternativamente, la dosis puede seleccionarse dentro de un intervalo de, por ejemplo, 0,001 a 100000 mg/cuerpo de un paciente, aunque la dosis no se limita necesariamente a estos valores numéricos. Aunque la dosis y el método de administración varían dependiendo del peso, edad, síntomas, etc., de un paciente, los expertos en la técnica pueden seleccionar de manera apropiada la dosis y el método.

También se proporciona la molécula de unión a antígeno de la presente invención para su uso en el tratamiento de cáncer.

35 40 45 Los códigos de tres letras y los códigos de una letra correspondientes de los aminoácidos usados en el presente documento se definen de la siguiente manera: alanina: Ala y A, arginina: Arg y R, asparagina: Asn y N, ácido aspártico: Asp y D, cisteína: Cys y C, glutamina: Gln y Q, ácido glutámico: Glu y E, glicina: Gly y G, histidina: His y H, isoleucina: Ile y I, leucina: Leu y L, lisina: Lys y K, metionina: Met y M, fenilalanina: Phe y F, prolina: Pro y P, serina: Ser y S, treonina: Thr y T, triptófano: Trp y W, tirosina: Tyr e Y, y valina: Val y V.

40 Los expertos en la técnica deberán entender que uno o cualquier combinación de dos o más de los aspectos descritos en el presente documento también se incluyen en la presente invención a menos que surja una contradicción técnica basándose en el sentido común técnico de los expertos en la técnica.

45 La presente invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

50 [Ejemplo 1] Concepto de región variable (Fab) de inmunoglobulina alterada que se une a CD3 (primer antígeno) y a otro antígeno (segundo antígeno), pero no se une a CD3 (primer antígeno) y a otro antígeno (segundo antígeno) en células diferentes al mismo tiempo

55 La unión de una inmunoglobulina a dos o más moléculas de Fc $\gamma$ R activante al mismo tiempo o a Fc $\gamma$ R activante y otro antígeno al mismo tiempo provoca la reacción de reticulación del Fc $\gamma$ R activante, lo que a su vez puede transducir señales de ITAM de Fc $\gamma$ R, dando como resultado la posible activación de inmuncitos. Una molécula de un anticuerpo de tipo IgG puede unirse únicamente a una molécula de Fc $\gamma$ R, tal como se describió anteriormente. Por tanto, dos o más moléculas de Fc $\gamma$ R activante se reticulan únicamente en presencia de un antígeno para activar inmuncitos.

60 65 Cuando un anticuerpo de tipo IgG se une a un antígeno a través de su región variable (Fab), este anticuerpo también puede unirse a una molécula de Fc $\gamma$ R a través de su región Fc al mismo tiempo con la misma. Esto provoca la reticulación entre una célula que expresa el antígeno y una célula que expresa Fc $\gamma$ R. Dependiendo de la célula que expresa el antígeno, tal reticulación entre el antígeno y Fc $\gamma$ R puede no ser favorable. Específicamente, cuando el antígeno es, por ejemplo, CD3, una célula T reticulada con una célula que expresa Fc $\gamma$ R puede provocar una activación inmunitaria tal como liberación de citocinas (J. Immunol. (1999), 1 de agosto, 163 (3), 1246-52). En tal caso, la región Fc puede perder su actividad de unión frente a Fc $\gamma$ R mediante la introducción de alteración para prevenir la reacción

de reticulación entre el antígeno y Fc $\gamma$ R (Advanced Drug Delivery Reviews (2006) 58, 640- 656). Asimismo, cuando los antígenos para anticuerpos de tipo IgG son, por ejemplo, moléculas de la superfamilia de TNFR (por ejemplo, CD40, OX40 y CD27) o CD3 y TLR (por ejemplo, TLR2, TLR4, TLR8 y TLR9), la reticulación mediada por Fc $\gamma$ R provoca una activación inmunitaria sistémica. Por tanto, la unión al mismo tiempo a estas moléculas expresadas en células independientes no es favorable.

Mientras tanto, un anticuerpo multiespecífico convencional se une a una pluralidad de antígenos al mismo tiempo. Dependiendo de la combinación de los antígenos, la unión a una pluralidad de antígenos al mismo tiempo puede no ser favorable. Por ejemplo, integrina  $\alpha\beta$ 3, conocida como molécula de adhesión, se expresa en muchas células cancerosas y vasos sanguíneos peritumorales y, como tal, es útil como molécula diana en la selección como diana de tumor (R. Haubner, PLoS Med., 2, e70 (2005)), mientras que también se sabe que esta molécula se expresa en diversas células normales (Thromb Haemost., noviembre de 1998; 80 (5): 726-34). Por tanto, la unión del anticuerpo multiespecífico tanto a CD3 como a integrina  $\alpha\beta$ 3 al mismo tiempo puede dañar células normales debido a una potente actividad citotóxica mediada por células T.

Por consiguiente, un posible método para controlar tal reacción de reticulación desfavorable fue Fab de unión doble, que es una región variable (Fab) que se une al primer antígeno a través de una porción de la misma y se une al segundo antígeno a través de una porción diferente que no participa en esta unión al primer antígeno (figura 1). Siempre que dos restos posicionados de manera proximal en una región variable (Fab) sean esenciales para la unión a sus antígenos respectivos, tal como se muestra en la figura 1, la unión al primer antígeno inhibe la unión al segundo antígeno mientras que la unión al segundo antígeno también inhibe la unión al primer antígeno. Por tanto, un anticuerpo modificado que tiene las propiedades de tal Fab de unión doble no puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo y, por tanto, supuestamente no provoca ninguna reacción de reticulación entre el primer antígeno y el segundo antígeno (figura 2). Además, se considera que el Fab de unión doble puede unirse tanto al primer antígeno como al segundo antígeno al mismo tiempo cuando el primer antígeno y el segundo antígeno no se expresan en membranas celulares, como con proteínas solubles, o ambos residen en la misma célula, pero no puede ni unirse a estos antígenos expresados, cada uno, en una célula diferente al mismo tiempo ni reticular estas dos células (figura 3). Por otro lado, un antígeno (tercer antígeno) que se une a otra región variable (Fab) puede experimentar una reacción de reticulación con el primer antígeno (figura 4) o puede experimentar una reacción de reticulación con el segundo antígeno (figura 5). Para este anticuerpo, puede usarse una región Fc que se une a Fc $\gamma$ R como región constante, o puede usarse una región Fc que tiene actividad de unión reducida frente a Fc $\gamma$ R como región constante.

Mediante el uso de las propiedades de tal Fab de unión doble, por ejemplo, a una técnica de dañar células cancerosas que expresan un antígeno cancerígeno mediante el redireccionamiento de células T mediado por anticuerpo se le puede proporcionar adicionalmente una función de seleccionar como diana integrina en tejidos cancerosos y de ese modo lograr una especificidad de cáncer superior.

En resumen, si puede modificarse una región variable (Fab) como Fab de unión doble para conferir las siguientes propiedades, puede desarrollarse un anticuerpo que tiene los efectos mostrados en la figura 1:

1. tener actividad de unión frente al primer antígeno;
2. tener actividad de unión frente al segundo antígeno; y
3. no unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo.

La expresión "no unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo" también incluye no reticular una célula que expresa el primer antígeno a una célula que expresa el segundo antígeno, o no unirse al primer antígeno y al segundo antígeno expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo. Estas expresión incluye además el caso en el que la región variable puede unirse tanto al primer antígeno como al segundo antígeno al mismo tiempo cuando el primer antígeno y el segundo antígeno no se expresan en membranas celulares, como con proteínas solubles, o ambos residen en la misma célula, pero no puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno expresados, cada uno, en una célula diferente, al mismo tiempo.

Asimismo, si puede modificarse una región variable (Fab) como Fab de unión doble para conferir las siguientes propiedades, puede desarrollarse un anticuerpo que tiene, por ejemplo, los efectos mostrados en la figura 6:

1. tener actividad de unión frente al primer antígeno en una célula T;
2. tener actividad de unión frente al segundo antígeno en una célula presentadora de antígeno; y
3. no unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo.

65 [Ejemplo 2] Preparación de anticuerpo CE115 anti-CD3 $\epsilon$  humano y anti-CD3 $\epsilon$  de macaco cangrejero

(2-1) Preparación de hibridoma usando rata inmunizada con célula que expresa CD3 humano y célula que expresa CD3 de macaco cangrejero

5 Se inmunió cada rata SD (hembra, 6 semanas de edad al inicio de la inmunización, Charles River Laboratories Japan, Inc.) con células Ba/F3 que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  humano o CD3 $\epsilon\gamma$  de macaco cangrejero de la siguiente manera: en el día 0 (se definió la fecha de sensibilización como día 0), se administraron por vía intraperitoneal 5 x 10<sup>7</sup> células Ba/F3 que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  humano junto con un adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Inc.) a la rata. En el día 14, se administraron por vía intraperitoneal 5 x 10<sup>7</sup> células Ba/F3 que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  de macaco cangrejero a la misma junto con un adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Inc.). Despues, se administraron por vía intraperitoneal 5 x 10<sup>7</sup> células Ba/F3 que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  humano y células Ba/F3 que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  de macaco cangrejero a la misma un total de cuatro veces cada dos semanas de una manera alternante. Una semana despues (en el día 49) de la administración final de CD3 $\epsilon\gamma$ , se administraron por vía intravenosa células Ba/F3 que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  humano a la misma como refuerzo. Tres días despues de eso, se fusionaron las células del bazo de la rata con células de mieloma de ratón SP2/0 según un método rutinario usando PEG 1500 (Roche Diagnostics K.K.). Se cultivaron las células de fusión, es decir, hibridomas, en un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 % (denominado a continuación en el presente documento FBS al 10 %/RPMI1640).

20 En el día despues de la fusión, (1) se suspendieron las células de fusión en un medio semiliquido (Stemcell Technologies, Inc.). Se cultivaron selectivamente los hibridomas y tambien se colonizaron.

25 Nueve o diez días tras la fusión, se escogieron colonias de hibridoma y se inocularon a 1 colonia/pocillo en una placa de 96 pocillos que contenía un medio selectivo de HAT (FBS al 10 %/RPMI1640, el 2 % en volumen de HAT concentrado 50 veces (Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.), y el 5 % en volumen de BM-Condimed H1 (Roche Diagnostics K.K.)). Despues de un cultivo de 3 a 4 días, se recuperó el sobrenadante de cultivo en cada pocillo y se midió la concentración de IgG de rata en el sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo que se confirmó que contenía IgG de rata se examinó para seleccionar un clon que producía un anticuerpo que se unía específicamente a CD3 $\epsilon\gamma$  humano mediante ELISA de células usando células Ba/F3 unidas que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  humano o células Ba/F3 unidas que no expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  humano (figura 7). Tambien se evaluó el clon para detectar reactividad cruzada con CD3 $\epsilon\gamma$  de macaco mediante ELISA de células usando células Ba/F3 unidas que expresaban CD3 $\epsilon\gamma$  de macaco cangrejero (figura 7).

(2-2) Preparación de anticuerpo quimérico anti-CD3 $\epsilon$  humano y anti-CD3 $\epsilon$  de macaco

35 Se extrajo ARN total a partir de cada célula de hibridoma usando kits RNeasy Mini (Qiagen N.V.) y se sintetizó ADNc usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (BD Biosciences). Se usó el ADNc preparado en PCR para insertar el gen de región variable de anticuerpo en un vector de clonación. Se determinó la secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN usando el kit de secuenciación de ciclos BigDye Terminator (Applied Biosystems, Inc.) y un secuenciador de ADN, secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Inc.) según el método descrito en el manual de instrucciones incluido en el mismo. Se determinaron las CDR y FR del dominio variable de cadena H de CE115 (SEQ ID NO: 13) y el dominio variable de cadena L de CE115 (SEQ ID NO: 14) según la numeración de Kabat.

45 Se integraron un gen que codificaba para una cadena H de anticuerpo quimérico que contenía el dominio variable de cadena H de anticuerpo de rata unido a un dominio constante de cadena de IgG1 de anticuerpo humano, y un gen que codificaba para una cadena L de anticuerpo quimérico que contenía el dominio variable de cadena L de anticuerpo de rata unido a un dominio constante de cadena kappa de anticuerpo humano, en vectores de expresión para células de animales. Se usaron los vectores de expresión preparados para la expresión y purificación del anticuerpo quimérico CE115 (ejemplo de referencia 1).

50 (2-3) Preparación de EGFR\_ERY22\_CE115

A continuación, se usó IgG frente a un antígeno cancerígeno (EGFR) como estructura principal para preparar una molécula en una forma con un Fab sustituido por dominios de unión a CD3 $\epsilon$ . En esta operación, se usó Fc silencioso que tenía actividad de unión atenuada frente a FcgR (receptor de Fc $\gamma$ ), como en el caso mencionado anteriormente, como Fc de la IgG de estructura principal. Se usaron VH de cetuximab (SEQ ID NO: 15) y VL de cetuximab (SEQ ID NO: 16) que constituyen la región variable de cetuximab como dominios de unión a EGFR. Se usaron G1d derivado de IgG1 mediante la delección de Gly y Lys C-terminales, A5 derivado de G1d mediante la introducción de mutaciones D356K y H435R, y B3 derivado de G1d mediante la introducción de una mutación K439E, como dominios constantes de cadena H de anticuerpo y se combinaron, cada uno, con VH de cetuximab para preparar VH de cetuximab-G1d (SEQ ID NO: 17), VH de cetuximab-A5 (SEQ ID NO: 18) y VH de cetuximab-B3 (SEQ ID NO: 19) según el método del ejemplo de referencia 1. Cuando el dominio constante de cadena H de anticuerpo se designó H1, la secuencia correspondiente a la cadena H de anticuerpo que tenía VH de cetuximab como dominio variable se representó mediante VH de cetuximab-H1.

65

En este contexto, la alteración de un aminoácido se representa, por ejemplo, por D356K. La primera letra (que corresponde a D en D356K) significa una letra que representa el código de una letra del residuo de aminoácido antes de la alteración. El número (que corresponde a 356 en D356K) que sigue a la letra significa la posición de numeración de EU de este residuo alterado. La última letra (que corresponde a K en D356K) significa una letra que representa el código de una letra de un residuo de aminoácido tras la alteración.

5 Se preparó EGFR\_ERY22\_CE115 (figura 8) mediante el intercambio entre el dominio de VH y el dominio de VL de Fab frente a EGFR. Específicamente, se preparó una serie de vectores de expresión que tenían un inserto de cada polinucleótido que codifica para EGFR ERY22\_Hk (SEQ ID NO: 20), EGFR ERY22\_L (SEQ ID NO: 21),  
10 CE115\_ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 22) o CE115\_ERY22\_L (SEQ ID NO: 23) mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica, tal como PCR, usando cebadores con una secuencia apropiada añadida de la misma manera que el método anteriormente mencionado.

15 Se transfirieron los vectores de expresión en la siguiente combinación a células FreeStyle 293-F en las que cada molécula de interés se expresó de manera transitoria:

Molécula de interés: EGFR\_ERY22\_CE115

20 Polipéptidos codificados por los polinucleótidos insertados en los vectores de expresión: EGFR ERY22\_Hk, EGFR ERY22\_L, CE115\_ERY22\_Hh, y CE115\_ERY22\_L

(2-4) Purificación de EGFR\_ERY22\_CE115

25 Se añadió el sobrenadante de cultivo obtenido a columna de M2 anti-FLAG (Sigma-Aldrich Corp.) y se lavó la columna, seguido por elución con péptido FLAG 0,1 mg/ml (SigmaAldrich Corp.). Se añadió la fracción que contenía la molécula de interés a una columna de HisTrap HP (GE Healthcare Japan Corp.) y se lavó la columna, seguido por elución con el gradiente de concentración de imidazol. Se concentró la fracción que contenía la molécula de interés mediante ultrafiltración. Después, se añadió esta fracción a columna de Superdex 200 (GE Healthcare Japan Corp.). Solo se recuperó una fracción de monómero a partir del eluato para obtener cada molécula de interés purificada.

30 (2-5) Medición de actividad citotóxica usando células mononucleares de sangre periférica humanas

(2-5-1) Preparación de disolución de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC)

35 Se extrajeron 50 ml de sangre periférica de cada voluntario sano (adulto) usando una jeringa previamente cargada con 100 µl de 1.000 unidades/ml de una disolución de heparina (Novo-Heparin, 5.000 unidades para inyección, Novo Nordisk A/S). Se diluyó la sangre periférica 2 veces con PBS(-) y después se dividió en cuatro partes iguales, que después se añadieron a tubos de separación de linfocitos Leucosep (n.º de cat. 227290, Greiner Bio-One GmbH) previamente cargados con 15 ml de Ficoll-Paque PLUS y centrifugados por adelantado. Tras la centrifugación (2.150 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) de los tubos de separación, se separó una fase de fracción de células mononucleares. Se lavaron las células en la fracción de célula mononucleares una vez con medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía FBS al 10 % (Sigma-Aldrich Corp.; denominado a continuación en el presente documento FBS al 10 %/D-MEM). Después, se ajustaron las células a una célula densidad de  $4 \times 10^6$  células/ml con FBS al 10 %/D-MEM. Se usó la disolución de células así preparada como disolución de PBMC humanas en la prueba posterior.

45 (2-5-2) Medición de actividad citotóxica

50 Se evaluó la actividad citotóxica basándose en la tasa de inhibición del crecimiento celular usando un analizador celular en tiempo real xCELLigence (Roche Diagnostics). Las células diana usadas fueron una línea celular SK-pca13a establecida forzando una línea celular SK-HEP-1 a expresar EGFR humano. Se disoció SK-pca13a a partir de la placa y se inoculó a 100 µl/pocillo ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) en una placa E-Plate 96 (Roche Diagnostics) para empezar el ensayo de células vivas usando el analizador celular en tiempo real xCELLigence. Al día siguiente, se sacó la placa del analizador celular en tiempo real xCELLigence y se añadieron 50 µl de cada anticuerpo ajustado a cada concentración (0,004, 0,04, 0,4 y 4 nM) a la placa. Tras la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadieron a la misma 50 µl ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) de la disolución de PBMC humanas preparada en el párrafo anterior (2-5-1). Volvió a cargarse esta placa en el analizador celular en tiempo real xCELLigence para empezar el ensayo de células vivas. Se llevó a cabo la reacción en condiciones del 5 % de CO<sub>2</sub> y 37°C. 72 horas tras la adición de PBMC humanas. Se determinó la tasa de inhibición del crecimiento celular (%) a partir del valor de índice celular según la expresión facilitada a continuación. Se usó un valor numérico tras la normalización frente al valor de índice celular inmediatamente antes de la adición del anticuerpo definido como 1 como valor de índice celular en este cálculo.

60 Tasa de inhibición del crecimiento celular (%)= (A - B) x 100 / (A - 1), donde

65 A representa el valor de índice celular promedio de pocillos no complementados con el anticuerpo (solo las células diana y PBMC humanas), y B representa el valor de índice celular promedio de los pocillos complementados con cada

anticuerpo. La prueba se realizó por triplicado.

Se midió la actividad citotóxica de EGFR\_ERY22\_CE115 que contenía CE115 con PBMC preparadas a partir de sangre humana como células efectoras. Como resultado, se confirmó una actividad muy fuerte (figura 9).

[Ejemplo 3] Preparación de anticuerpo que se une a CD3 y a integrina  $\alpha\beta\gamma$  humana, pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo

Tal como se muestra en las figuras 1 a 6, el Fab de unión doble es una molécula que se une a CD3 (primer antígeno) y al antígeno de interés (segundo antígeno) a través de su región variable (Fab), pero no se une a CD3 (primer antígeno) y al antígeno de interés (segundo antígeno) al mismo tiempo. En el caso de introducir una alteración de aminoácido para la unión al segundo antígeno en una región Fab de anticuerpo de unión a CD3 (primer antígeno), la alteración de aminoácido se introduce habitualmente en ambas de dos cadenas H o cadenas L. Como resultado de introducir la alteración en ambas de las cadenas H o las cadenas L, los dos Fab de anticuerpo pasan a poder unirse a dos antígenos, respectivamente. Por tanto, estos dos Fab pueden unirse a CD3 (primer antígeno) y al antígeno de interés (segundo antígeno) al mismo tiempo reticulándolos. Por tanto, se prepara un Fab del anticuerpo como Fab que se une a un tercer antígeno o a nada, y se prepara el otro Fab como Fab de unión doble para prevenir la reacción de reticulación entre CD3 (primer antígeno) y el antígeno de interés (segundo antígeno).

(3-1) Preparación de anticuerpo que se une a CD3 y a integrina  $\alpha\beta\gamma$  humana, pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo

Integrina  $\alpha\beta\gamma$ , conocida como molécula de adhesión, se expresa en muchas células cancerosas y vasos sanguíneos peritumorales y, como tal, es útil como molécula diana en la selección como diana de tumor, mientras que también se sabe que esta molécula se expresa en diversas células normales (Thromb Haemost., noviembre de 1998; 80 (5): 726-34). Por tanto, la unión a CD3 y a integrina  $\alpha\beta\gamma$  al mismo tiempo puede dañar células normales debido a una potente actividad citotóxica mediada por células T. Por consiguiente, se supuso que una molécula de anticuerpo anti-EGFR puede seleccionar como diana células tumorales que expresan integrina  $\alpha\beta\gamma$  sin dañar células normales, si puede prepararse una molécula que no se une a CD3 y a integrina  $\alpha\beta\gamma$  al mismo tiempo. Por tanto, se llevó a cabo un estudio para obtener un Fab de unión doble molécula que pueda unirse a EGFR a través de una región variable (Fab) y unirse al primer antígeno CD3 y al segundo antígeno integrina  $\alpha\beta\gamma$  a través de la otra región variable, pero que no pueda unirse a CD3 y a integrina  $\alpha\beta\gamma$  al mismo tiempo.

Dado que puede mostrarse que una "molécula que se une a CD3 a través de una región Fab en condiciones libres de integrina  $\alpha\beta\gamma$  y se une a integrina  $\alpha\beta\gamma$  a través de la otra región Fab en condiciones libres de CD3" es una "molécula que no se une a integrina  $\alpha\beta\gamma$  en un estado unido con CD3 o no se une a CD3 en un estado unido con integrina  $\alpha\beta\gamma$ ", puede concluirse que se ha desarrollado satisfactoriamente una molécula de Fab de unión doble que tiene las propiedades de Fab de unión doble de interés (es decir, las propiedades de poder unirse a CD3 y al segundo antígeno, pero no unirse a CD3 y al segundo antígeno al mismo tiempo).

(3-2) Obtención de anticuerpo que tiene región Fab que se une a integrina  $\alpha\beta\gamma$

Métodos posibles para obtener la molécula de Fab de unión doble fueron un método que usa bibliotecas y un método que usa la inserción de un péptido que se sabe que tiene actividad de unión frente a una proteína. Se conoce un péptido RGD (Arg-Gly-Asp) como péptido que tiene actividad de unión frente a integrina  $\alpha\beta\gamma$ . Por tanto, se insertó el péptido RGD en la el bucle de cadena pesada del anticuerpo CE115 de unión a CD3e (dominio variable de cadena pesada: SEQ ID NO: 13, dominio variable de cadena ligera: SEQ ID NO: 14) para preparar cada anticuerpo heterodimerizado que tenía dominios de unión a EGFR en un Fab y un dominio de unión a CD3 y un dominio de unión a integrina  $\alpha\beta\gamma$  en el otro Fab según el ejemplo de referencia 1. Específicamente, se preparó una serie de vectores de expresión para tener un inserto de cada polinucleótido que codifica para EGFR ERY22\_Hk (SEQ ID NO: 20), EGFR ERY22\_L (SEQ ID NO: 21) o CE115\_ERY22\_L (SEQ ID NO: 23) así como un polinucleótido que codifica para cualquiera de los siguientes fragmentos:

CE115\_2 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 24 con posiciones de numeración de Kabat 52b y 53 sustituidas por K y N, respectivamente),

CE115\_4 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 25 con posiciones de numeración de Kabat 52b y 54 sustituidas por S y N, respectivamente),

CE115\_9 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 26 con RGD insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 52a y 52b),

CE115\_10 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 27 con RGD insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 52b y 52c),

CE115\_12 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 28 con RGD insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 72 y 73),

CE115\_17 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 29 con posiciones de numeración de Kabat 52b y 52c sustituidas por K y S, respectivamente),

CE115\_47 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 30 con RGD insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 98 y 99),

CE115\_48 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 31 con RGD insertado entre posiciones de numeración de Kabat 99 y 100), y

CE115\_49 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 32 con RGD insertado entre posiciones de numeración de Kabat 100 y 100a).

Además, se preparó un anticuerpo (EH240-Kn125/EH240-HI076/L73; SEQ ID NO: 33/34/35) con el péptido RGD (Arg-Gly-Asp) insertado en una región de CH3 de anticuerpo notificado en J. Biotech, 155, 193-202, 2011, como control según el ejemplo de referencia 1. Se supone que esta molécula que se une a integrina  $\alpha v\beta 3$  a través de su región de CH3 puede unirse a CD3 y a integrina  $\alpha v\beta 3$  al mismo tiempo.

#### 15 (3-3) Confirmación de la unión de anticuerpo a integrina $\alpha v\beta 3$

Se evaluó cada molécula con el péptido RGD (Arg-Gly-Asp) insertado en la región Fab para determinar su unión a integrina  $\alpha v\beta 3$  mediante el método de electroquimioluminiscencia (método de ECL). Específicamente, biotina-Ac anti-IgG humana (Southern Biotech) diluido con una disolución de TBS que contenía BSA al 0,1 %, cloruro de calcio 0,1 g/l y cloruro de magnesio 0,1 g/l (denominada disolución de dilución(+)), cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 5  $\mu$ g/ml o 1  $\mu$ g/ml, e integrina  $\alpha v\beta 3$  (R&D Systems, Inc.) marcada con sulfo-tag, se añadieron, cada uno, a 25  $\mu$ l/pocillo a placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa durante la noche a 4°C para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBS que contenía BSA al 0,5 %, cloruro de calcio 0,1 g/l y cloruro de magnesio 0,1 g/l (denominada disolución de bloqueo(+)) a 150  $\mu$ l/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa durante la noche a 4°C. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250  $\mu$ l de una disolución de TBS que contenía cloruro de calcio 0,1 g/l y cloruro de magnesio 0,1 g/l (denominada disolución de TBS(+)). Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 75  $\mu$ l/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas de modo que el biotina-Ac anti-IgG humana se unió a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBS(+) y se añadió tampón READ (MSD K.K.) a la misma a 150  $\mu$ l/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

Los resultados se muestran en la figura 11. El anticuerpo original EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L no mostró ninguna actividad de unión frente a integrina  $\alpha v\beta 3$ , mientras que se observó que la totalidad de EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_2 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_4 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_9 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_10 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_12 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_17 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_47 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_48 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_49 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L se unían a integrina  $\alpha v\beta 3$ .

#### 45 (3-4) Confirmación de la unión de anticuerpo a CD3 (CD3 $\epsilon$ )

A continuación, se evaluó cada anticuerpo que tenía una región Fab de unión a integrina  $\alpha v\beta 3$  preparado en la sección anterior para determinar si conservaba actividad de unión frente a CD3 mediante el método de ECL. Específicamente, biotina-Ac anti-IgG humana (Southern Biotech) diluido con una disolución de TBS que contenía BSA al 0,1 % (denominada disolución de dilución(-)), cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 5  $\mu$ g/ml o 1  $\mu$ g/ml, y proteína homodimérica de CD3 $\epsilon$  marcada con sulfo-tag se añadieron, cada uno, a 25  $\mu$ l/pocillo a placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa durante la noche a 4°C para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBS que contenía BSA al 0,5 % (denominada disolución de bloqueo (-)) a 150  $\mu$ l/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa durante la noche a 4°C. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250  $\mu$ l de una disolución de TBS(-). Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 75  $\mu$ l/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas de modo que el biotina-Ac anti-IgG humana se unió a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBS(-) y se añadió tampón READ (MSD K.K.) a la misma a 150  $\mu$ l/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

Los resultados se muestran en la figura 12. Se observó que la totalidad del anticuerpo original EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L así como EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_2 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_4 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_9 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_10 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_12 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR

ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_17 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_47 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_48 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_49 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L se unían a CD3.

5 (3-5) Confirmación de que la región Fab no se une a integrina  $\alpha v\beta 3$  y CD3 al mismo tiempo mediante método de ECL

Tal como resulta evidente a partir de los resultados de los párrafos anteriores, las moléculas obtenidas tenían actividad de unión frente a integrina  $\alpha v\beta 3$  y tenían actividad de unión frente a CD3. A continuación, se evaluó cada región Fab preparada en los párrafos anteriores para determinar si se unía a CD3 (CD3 $\varepsilon$ ) y a integrina  $\alpha v\beta 3$  al mismo tiempo.

10 Cuando una molécula con el péptido RGD (Arg-Gly-Asp) insertado en la región Fab se une a integrina  $\alpha v\beta 3$  y a CD3 al mismo tiempo, su unión a ambos antígenos puede detectarse mediante el método de ECL añadiendo integrina  $\alpha v\beta 3$  y CD3 biotinilado a la disolución de anticuerpo. Específicamente, proteína homodimérica de CD3 $\varepsilon$  humana biotinilada diluida con una disolución de dilución(+), cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 10  $\mu$ g/ml o 5  $\mu$ g/ml, e integrina  $\alpha v\beta 3$  (R&D Systems, Inc.) marcada con sulfo-tag se añadieron, cada uno, a 25  $\mu$ l/pocillo a placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa durante la noche a 4°C para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de bloqueo(+) a 150  $\mu$ l/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa durante la noche a 4°C. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250  $\mu$ l de una disolución de TBS(+) que contenía cloruro de calcio 0,1 g/l y cloruro de magnesio 0,1 g/l. Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 75  $\mu$ l/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas de modo que el biotina-Ac anti-IgG humana se unió a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBS(+) y se añadió tampón READ (MSD K.K.) a la misma a 150  $\mu$ l/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

25 Los resultados se muestran en las figuras 13 y 14. EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_2 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_12 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_17 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L con el péptido RGD (Arg-Gly-Asp) insertado en la región Fab se unieron a integrina  $\alpha v\beta 3$  y a CD3 al mismo tiempo, dando como resultado la fuerte señal detectada en el ensayo de ECL. En cambio, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_9 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_48 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L solo produjeron una señal débil en este ensayo (figura 13). La totalidad de EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_4 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_10 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_47 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_49 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L produjeron con poca frecuencia una señal detectable en el ensayo de ECL (figura 14). Estos resultados sugirieron que estos anticuerpos no se unen a integrina  $\alpha v\beta 3$  en un estado unido con CD3.

40 (3-6) Discusión sobre resultados del método de ECL que muestran que la región Fab no se une a integrina  $\alpha v\beta 3$  y a CD3 al mismo tiempo

45 Tal como resulta evidente a partir de los resultados descritos anteriormente, el anticuerpo desarrollado tenía las propiedades de la molécula de Fab de unión doble uniéndose a cada uno de CD3 (CD3 $\varepsilon$ ) e integrina  $\alpha v\beta 3$  a través de un Fab, pero sin unirse a CD3 (CD3 $\varepsilon$ ) y a integrina  $\alpha v\beta 3$  al mismo tiempo. En este ejemplo, el péptido RGD que se une al segundo antígeno, integrina  $\alpha v\beta 3$ , se insertó en la región variable (Fab) del anticuerpo que tiene esta región variable que se une al primer antígeno CD3 para obtener satisfactoriamente una molécula que estaba dotada de la actividad de unión frente al segundo antígeno, pero no se unía a CD3 y al segundo antígeno al mismo tiempo. Mediante métodos similares, un péptido que tiene actividad de unión frente a una proteína tal como se ilustra en el documento WO2006036834 puede insertarse en el bucle de Fab para obtener una molécula de Fab de unión doble que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario. El péptido que muestra actividad de unión frente a una proteína puede obtenerse preparando una biblioteca de péptidos mediante el uso de un método generalmente conocido por los expertos en la técnica y seleccionando un péptido que tiene la actividad deseada a partir de la biblioteca (Pasqualini R., Nature, 1996, 380 (6572): 364-6). Además, puede usarse una biblioteca de moléculas de unión a antígeno preparadas mediante alteración para dar una longitud (extensión) más grande de bucles en Fab tal como se describe en el ejemplo 5 para desarrollar una molécula de Fab de unión doble que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario. Las regiones variables frente al primer antígeno pueden obtenerse mediante diversos métodos generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Por tanto, puede concluirse que tales bibliotecas pueden usarse para desarrollar moléculas de Fab de unión doble que tienen actividad de unión frente a un primer antígeno arbitrario y un segundo antígeno arbitrario, pero no pueden unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo.

50 60 Los resultados descritos anteriormente indicaron que EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_4 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_10 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_47 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_49 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L se unen a CD3 y a integrina  $\alpha v\beta 3$ , pero no se unen a CD3 y a

5 integrina  $\alpha\beta 3$  al mismo tiempo. Estos resultados demostraron que EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_4 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_10 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_47 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_49 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L son moléculas que tienen Fab de unión doble, y pueden desarrollarse tales moléculas.

[Ejemplo 4] Preparación de anticuerpo que se une a CD3 y a receptor tipo Toll 2 (TLR2) humano, pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo

10 (4-1) Preparación de anticuerpo que se une a CD3 y a TLR2 humano, pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo

15 TLR2, conocido como receptor de reconocimiento de patrón, se expresa principalmente en inmunocitos tales como macrófagos, células dendríticas o células B y es útil como molécula diana que activa los inmunocitos. También se sabe que TLR2 se expresa en células normales distintas de inmunocitos, tales como células epiteliales o células endoteliales. La unión de un antígeno cancerígeno y CD3 al mismo tiempo recluta células T que expresan CD3 en un entorno tumoral de modo que las células T dañan las células cancerosas. En este caso, la unión del antígeno cancerígeno y TLR2 al mismo tiempo también puede reclutar inmunocitos que expresan TLR2 en el entorno tumoral, supuestamente activando los inmunocitos. Las células cancerosas dañadas por las células T se captan por los inmunocitos reclutados mediante TLR2. El antígeno puede procesarse y presentarse en HLA para activar las células T. Esto puede activar más intensamente las células T y también inducir inmunidad adquirida. Sin embargo, la unión a CD3 y a TLR2 al mismo tiempo puede dañar los inmunocitos y las células normales debido a una potente actividad citotóxica mediada por células T. Por consiguiente, se supuso que pueden reclutarse inmunocitos y células normales que expresan TLR2 sin dañar estas células, si puede prepararse una molécula que no se une a CD3 y a TLR2 al mismo tiempo. Por tanto, se realizó un estudio para obtener una molécula de Fab de unión doble que puede unirse a EGFR a través de una región variable (Fab) y unirse al primer antígeno CD3 y al segundo antígeno TLR2 a través de la otra región variable, pero que no puede unirse a CD3 y a TLR2 al mismo tiempo.

30 Dado que puede mostrarse que una "molécula que se une a CD3 a través de una región Fab en condiciones libres de TLR2 y se une a TLR2 a través de la otra región Fab en condiciones libres de CD3" es una "molécula que no se une a TLR2 en un estado unido con CD3 o no se une a CD3 en un estado unido con TLR2", puede concluirse que se ha desarrollado satisfactoriamente una molécula de Fab de unión doble que tiene las propiedades de Fab de unión doble de interés (es decir, las propiedades de unirse a CD3 y al segundo antígeno, pero no unirse a CD3 y al segundo antígeno al mismo tiempo).

35 (4-2) Obtención de anticuerpo que tiene una región Fab que se une a TLR2

40 Se conoce un péptido RWGYHLRDRKYKGVRSHKGVPR (SEQ ID NO: 36) como péptido que tiene actividad de unión frente a TLR2 humano. Por tanto, se insertó el péptido de unión a TLR2 en el bucle de cadena pesada del anticuerpo CE115 de unión a CD3 $\varepsilon$  (dominio variable de cadena pesada: SEQ ID NO: 13, dominio variable de cadena ligera: SEQ ID NO: 14) para preparar cada anticuerpo heterodimerizado que tenía dominios de unión a EGFR en un Fab y un dominio de unión a CD3 y un dominio de unión a TLR2 en el otro Fab según el ejemplo de referencia 1. Específicamente, se preparó una serie de vectores de expresión para tener un inserto de cada polinucleótido que codifica para EGFR ERY22\_Hk (SEQ ID NO: 20), EGFR ERY22\_L (SEQ ID NO: 21) o CE115\_ERY22\_L (SEQ ID NO: 23) así como un polinucleótido que codifica para cualquiera de los siguientes fragmentos:

45 CE115\_DU21 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 37 con el péptido de unión a TLR2 insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 52b y 52c),

50 CE115\_DU22 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 38 con el péptido de unión a TLR2 insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 52b y 52c),

55 CE115\_DU26 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 39 con el péptido de unión a TLR2 insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 72 y 73), y

CE115\_DU27 ERY22\_Hh (SEQ ID NO: 40 con el péptido de unión a TLR2 insertado entre las posiciones de numeración de Kabat 72 y 73).

60 Además, se preparó un anticuerpo (CE115\_ERY22\_DU42\_Hh, SEQ ID NO: 41) con el péptido de unión a TLR2 añadido al extremo C-terminal de la región de CH3, y un anticuerpo (CE115\_ERY22\_DU43\_Hh, SEQ ID NO: 42) en el que un péptido de unión a TLR2 que tiene residuos Cys en ambos extremos se añadió al extremo C-terminal de la región de CH3, como controles según el ejemplo de referencia 1. Se supone que estas moléculas que se unen a TLR2 a través de sus regiones de CH3 pueden unirse a CD3 y a TLR2 al mismo tiempo.

65 (4-3) Confirmación de la unión de anticuerpo a TLR2

Se evaluó cada molécula con el péptido de unión a TLR2 insertado en la región Fab para determinar su unión a TLR2 mediante el método de electroquimioluminiscencia (método de ECL). Específicamente, biotina-Ac anti-IgG humana (Southern Biotech) diluido con una disolución de TBS que contenía BSA al 0,1 % (denominada disolución de dilución(-)), cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 5 µg/ml o 1 µg/ml, y TLR2 (Abnova Corp.) marcado con sulfo-tag se añadieron, cada uno, a 25 µl/pocillo a placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa durante la noche a 4°C para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBS que contenía BSA al 0,5 % (denominada disolución de bloqueo(-)) a 150 µl/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa durante la noche a 4°C. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250 µl de una disolución de TBS(-). Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 75 µl/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas de modo que el biotina-Ac anti-IgG humana se unió a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBS(-) y se añadió tampón READ (MSD K.K.) a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

Los resultados se muestran en la figura 15. El anticuerpo original EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L no mostró ninguna actividad de unión frente a TLR2, mientras que se observó que la totalidad de EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU21 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU22 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU26 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU27 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L se unían a TLR2.

#### (4-4) Confirmación de la unión de anticuerpo a CD3 (CD3ε)

A continuación, se evaluó cada anticuerpo que tenía una región Fab de unión a TLR2 preparado en la sección anterior para determinar si conservaba actividad de unión frente a CD3 (CD3ε) mediante el método de ECL. Específicamente, biotina-Ac anti-IgG humana (Southern Biotech) diluido con una disolución de TBS que contenía BSA al 0,1 % (denominada disolución de dilución(-)), cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 5 µg/ml o 1 µg/ml, y proteína homodimérica de CD3ε marcada con sulfo-tag se añadieron, cada uno, a 25 µl/pocillo a placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa durante la noche a 4°C para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBS que contenía BSA al 0,5 % (denominada disolución de bloqueo(-)) a 150 µl/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa durante la noche a 4°C. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250 µl de una disolución de TBS(-). Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 75 µl/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas de modo que el biotina-Ac anti-IgG humana se unió a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBS(-) y se añadió tampón READ (MSD K.K.) a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

Los resultados se muestran en la figura 16. Se observó que la totalidad del anticuerpo original EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L así como EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU21 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU22 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU26 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU27 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L se unían a CD3.

#### (4-5) Confirmación de que la región Fab no se une a TLR2 y a CD3 al mismo tiempo mediante método de ECL

Tal como resulta evidente a partir de los resultados de los párrafos anteriores, las moléculas obtenidas tenían actividad de unión frente a TLR2 y tenían actividad de unión frente a CD3. A continuación, se evaluó cada región Fab preparada en los párrafos anteriores para determinar si se unía a CD3 y a TLR2 al mismo tiempo.

Cuando una molécula con el péptido de unión a TLR2 insertado en la región Fab se une a TLR2 y a CD3 al mismo tiempo, su unión a ambos antígenos puede detectarse mediante el método de ECL añadiendo TLR2 y CD3 biotinilado a la disolución de anticuerpo. Específicamente, proteína homodimérica de CD3ε humano biotinilada diluida con una disolución de dilución(-), cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 10 µg/ml o 5 µg/ml, y TLR2 (R&D Systems, Inc.) marcado con sulfo-tag se añadieron, cada uno, a 25 µl/pocillo a placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa durante la noche a 4°C para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de bloqueo(-) a 150 µl/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa durante la noche a 4°C. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250 µl de una disolución de TBS(-) que contenía cloruro de calcio 0,1 g/l y cloruro de magnesio 0,1 g/l. Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 75 µl/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas de modo que el biotina-Ac anti-IgG humana se unió a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBS(-) y se añadió tampón READ (MSD K.K.) a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia

de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

Los resultados se muestran en la figura 17. EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU42 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU43 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L con el péptido de unión a TLR2 añadido a la región de CH3 se unieron a TLR2 y a CD3 al mismo tiempo, dando como resultado la fuerte señal detectada en el ensayo de ECL. En cambio, la totalidad de EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU21 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU22 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU26 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU27 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L produjeron con poca frecuencia una señal detectable en el ensayo de ECL. Estos resultados sugirieron que estos anticuerpos no se unen a TLR2 en un estado unido con CD3.

(4-6) Discusión sobre resultados del método de ECL que muestran que la región Fab no se une a TLR2 y a CD3 al mismo tiempo

Tal como resulta evidente a partir de los resultados descritos anteriormente, el anticuerpo desarrollado tenía las propiedades de la molécula de Fab de unión doble uniéndose a cada uno de CD3 y TLR2 a través de un Fab, pero sin unirse a CD3 y a TLR2 al mismo tiempo. En este ejemplo, el péptido RWGYHLRDRKYKGVRSHKGVPR que se une al segundo antígeno TLR2 se insertó en la región variable (Fab) del anticuerpo que tiene esta región variable que se une al primer antígeno CD3 para obtener satisfactoriamente una molécula que estaba dotada de la actividad de unión frente al segundo antígeno, pero no se unía a CD3 y al segundo antígeno al mismo tiempo. Mediante métodos similares, un péptido que tiene actividad de unión frente a una proteína tal como se ilustra en el documento WO2006036834 puede insertarse en el bucle de Fab para obtener una molécula de Fab de unión doble que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario. El péptido que muestra actividad de unión frente a una proteína puede obtenerse preparando una biblioteca de péptidos mediante el uso de un método generalmente conocido por los expertos en la técnica y seleccionando un péptido que tiene la actividad deseada a partir de la biblioteca (Pasqualini R., Nature, 1996, 380 (6572): 364-6). Además, puede usarse una biblioteca de moléculas de unión a antígeno preparadas mediante alteración para dar una longitud (extensión) más grande de bucles en Fab tal como se describe en el ejemplo 5 para desarrollar una molécula de Fab de unión doble que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario. Las regiones variables frente al primer antígeno pueden obtenerse mediante diversos métodos generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Por tanto, puede concluirse que tales bibliotecas pueden usarse para desarrollar moléculas de Fab de unión doble que tienen actividad de unión frente a un primer antígeno arbitrario y un segundo antígeno arbitrario, pero no pueden unirse al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo.

Los resultados descritos anteriormente indicaron que EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU21 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU22 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU26 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU27 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L se unen a CD3 y a TLR2, pero no se unen a CD3 y a TLR2 al mismo tiempo. Estos resultados demostraron que EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_DU21 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU22 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU26 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115 DU27 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L son moléculas que tienen Fab de unión doble, y pueden desarrollarse tales moléculas.

[Ejemplo 5] Alteración de anticuerpo para la preparación de anticuerpo que se une a CD3 y a segundo antígeno

(5-1) Estudio sobre el sitio de inserción y longitud de péptido que puede unirse a segundo antígeno

Se realizó un estudio para obtener una molécula de Fab de unión doble que podía unirse a un antígeno cancerígeno a través de una región variable (Fab) y unirse al primer antígeno CD3 y al segundo antígeno a través de la otra región variable, pero que no podía unirse a CD3 y al segundo antígeno al mismo tiempo. Se insertó un péptido GGS en el bucle de cadena pesada del anticuerpo CE115 de unión a CD3c para preparar cada anticuerpo heterodimerizado que tenía dominios de unión a EGFR en un Fab y dominios de unión a CD3 en el otro Fab según el ejemplo de referencia 1.

Específicamente, se prepararon EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE31 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/43/23) con GGS insertado entre K52B y S52c en CDR2, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE32 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/44/23) con un péptido GGSGGS (SEQ ID NO: 90) insertado en esta posición, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE33 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/45/23) con un péptido GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 91) insertado en esta posición. Asimismo, se prepararon EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE34 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/46/23) con GGS insertado entre D72 y D73 (bucle) en FR3, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE35 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/47/23) con una péptido GGSGGS (SEQ ID NO: 90) insertado en esta posición, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE36 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/48/23) con un péptido GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 91) insertado en esta posición. Además, se prepararon

5 EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE37 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/49/23) con GGS insertado entre A99 y Y100 en CDR3, EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE38 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/50/23) con un péptido GGSGGS insertado en esta posición, y EGFR ERY22\_Hk/EGFR ERY22\_L/CE115\_CE39 ERY22\_Hh/CE115\_ERY22\_L ((SEQ ID NO: 20/21/51/23) con un péptido GGSGGSGGS insertado en esta posición.

(5-2) Confirmación de la unión de anticuerpo CE115 con inserción de péptido GGS a CD3 $\epsilon$

10 La actividad de unión de cada anticuerpo preparado frente a CD3 $\epsilon$  se confirmó usando un dispositivo Biacore T100. Se inmovilizó un péptido de epítopo de CD3 $\epsilon$  biotinilado en un chip CM5 mediante estreptavidina y se inyectó el anticuerpo preparado en el mismo como analito y se analizó para determinar su afinidad de unión.

15 Los resultados se muestran en la tabla 2. La afinidad de unión de CE35, CE36, CE37, CE38 y CE39 para CD3 $\epsilon$  fue equivalente a la del anticuerpo CE115 original. Esto indicó que puede insertarse un péptido que se une al segundo antígeno en sus bucles. La afinidad de unión no se redujo en CE36 o CE39 con inserción de GGSGGSGGS. Esto indicó que la inserción de un péptido de hasta al menos 9 aminoácidos en estos sitios no influye en la actividad de unión frente a CD3 $\epsilon$ .

[Tabla 2]

Muestra	ka	kd	KD	Posición de inserción	Ligador
CE115_M	1,5E+05	9,8E-03	6,7E-08		
CE31	2,3E+05	3,5E-02	1,5E-07	K52b-S52c	GS3
CE32	8,5E+04	1,8E-02	2,1E-07	K52b-S52c	GS6
CE33	4,9E+05	1,1E-01	2,3E-07	K52b-S52c	GS9
CE34	1,1E+05	1,3E-02	1,2E-07	D72-D73	GS3
CE35	1,3E+05	1,1E-02	8,7E-08	D72-D73	GS6
CE36	1,2E+05	1,2E-02	9,9E-08	D72-D73	GS9
CE37	2,2E+05	2,0E-02	9,4E-08	A99-Y100	GS3
CE38	2,0E+05	1,7E-02	8,7E-08	A99-Y100	GS6
CE39	1,6E+05	1,4E-02	9,1E-08	A99-Y100	GS9

Estos resultados indicaron que puede prepararse el anticuerpo que puede unirse a CD3 y al segundo antígeno, pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo, obteniendo un anticuerpo que se une al segundo antígeno usando tal CE115 con inserción de péptido.

25 En este contexto, puede prepararse una biblioteca alterando de manera aleatoria la secuencia de aminoácidos del péptido para su uso en inserción o sustitución según un método conocido en la técnica tal como mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1985) 82, 488-492) o PCR de extensión por solapamiento, y comparando la actividad de unión, etc., de cada forma alterada según el método anteriormente mencionado para determinar un sitio de inserción o sustitución que permite ejercer la actividad de interés incluso después de la alteración de la secuencia de aminoácidos, y los tipos y longitud de aminoácidos de este sitio.

[Ejemplo 6] Diseño de biblioteca para obtener anticuerpo que se une a CD3 y a segundo antígeno

35 (6-1) Biblioteca de anticuerpos para obtener un anticuerpo que se une a CD3 y a segundo antígeno (también denominada biblioteca de Fab doble)

En el caso de seleccionar CD3 (CD3 $\epsilon$ ) como primer antígeno, los ejemplos de un método para obtener un anticuerpo que se une a CD3 (CD3 $\epsilon$ ) y a un segundo antígeno arbitrario incluyen los siguientes 6 métodos:

40 1. un método que implica insertar un péptido o un polipéptido que se une al segundo antígeno en un dominio de Fab que se une al primer antígeno (este método incluye la inserción de péptido mostrada en el ejemplo 3 o 4 así como un método de inserción de G-CSF ilustrado en Angew Chem Int Ed Engl., 5 de agosto de 2013; 52 (32): 8295-8), en el que el péptido o polipéptido de unión puede obtenerse a partir de una biblioteca de presentación de péptidos o polipéptidos, o puede usarse la totalidad o una porción de una proteína que se produce de manera natural;

45 2. un método que implica preparar una biblioteca de anticuerpos de tal manera que aparecen diversos aminoácidos en posiciones que permiten la alteración para dar una longitud (extensión) más grande de bucles de Fab tal como se muestra en el ejemplo 5, y obtener Fab que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario a partir de la biblioteca de anticuerpos usando la actividad de unión frente al antígeno como índice;

50 3. un método que implica identificar aminoácidos que conservan actividad de unión frente a CD3 mediante uso de un anticuerpo preparado mediante mutagénesis dirigida al sitio a partir de un dominio de Fab que se sabe anteriormente que se une a CD3, y obtener Fab que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario a partir de una

biblioteca de anticuerpos en la que aparecen los aminoácidos identificados usando la actividad de unión frente al antígeno como índice;

- 5        4. el método 3 que implica además preparar una biblioteca de anticuerpos de tal manera que aparecen diversos aminoácidos en posiciones que permiten la alteración para dar una longitud (extensión) más grande de bucles de Fab, y obtener Fab que tiene actividad de unión frente a un segundo antígeno arbitrario a partir de la biblioteca de anticuerpos usando la actividad de unión frente al antígeno como índice;
- 10      5. el método 1, 2, 3 o 4 que implica además alterar los anticuerpos de tal manera que aparecen secuencias de glicosilación (por ejemplo, NxS y NxT en las que x es un aminoácido distinto de P) para añadir a las mismas cadenas de azúcar que se reconocen mediante receptores de cadena de azúcar (por ejemplo, se añaden cadenas de azúcar de tipo de alto contenido en manosa y de ese modo se reconocen mediante receptores de alto contenido en manosa; se sabe que las cadenas de azúcar de tipo de alto contenido en manosa se obtienen mediante la adición de kifunensina en el momento de la expresión de anticuerpo (mAbs, julio-agosto de 2012; 4 (4): 475-87)); y
- 15      6. el método 1, 2, 3 o 4 que implica además añadir al mismo dominios (polipéptidos, cadenas de azúcar y ácidos nucleicos tipificados mediante agonistas de TLR) que se unen, cada uno, al segundo antígeno mediante un enlace covalente insertando Cys, Lys o un aminoácido no natural en bucles o sitios que se encuentra que pueden alterarse para dar diversos aminoácidos o sustituyendo estos sitios con Cys, Lys o un aminoácido no natural (este método se tipifica mediante conjugados de anticuerpo-fármaco y es un método para la conjugación a Cys, Lys o un aminoácido no natural mediante un enlace covalente (descrito en mAbs 6: 1, 34-45; enero/febrero de 2014; documento WO2009/134891 A2; y Bioconjug Chem., 19 de febrero de 2014; 25 (2): 351- 61)).
- 20      El Fab de unión doble que se une al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une a estos antígenos al mismo tiempo, se obtiene mediante el uso de cualquiera de estos métodos, y puede combinarse con dominios (denominados la otra región variable, que se describe en el ejemplo 1) que se unen a un tercer antígeno arbitrario mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cadenas L comunes, CrossMab o intercambio de ramas de Fab.
- 25      30      (6-2) Preparación de anticuerpo con una alteración de aminoácido de anticuerpo de unión a CD3 (CD3 $\varepsilon$ ) usando mutagénesis dirigida al sitio
- 30      Se seleccionaron un CE115HA000 de dominio de VH (SEQ ID NO: 52) y un GLS3000 de dominio de VL (SEQ ID NO: 53) como secuencias de molde para un anticuerpo de unión a CD3 (CD3 $\varepsilon$ ). Se sometió cada dominio a alteración de aminoácido en un sitio que se suponía que participa en la unión a antígeno según el ejemplo de referencia 1. Además, se usó pE22Hh (secuencia derivada de CH1 de IgG1 natural y secuencias posteriores mediante la alteración de L234A, L235A, N297A, D356C, T366S, L368A e Y407V, la delección de una secuencia de GK C-terminal y la adición de una secuencia de DYKDDDDK (SEQ ID NO: 89); SEQ ID NO: 54) como dominio constante cadena H, y se usó una cadena kappa (SEQ ID NO: 55) como dominio constante de cadena L. Los sitios de alteración se muestran en la tabla 3. Para la evaluación de la actividad de unión a CD3 (CD3 $\varepsilon$ ), se obtuvo cada anticuerpo con una alteración de aminoácido como un anticuerpo de una rama (anticuerpo de IgG que se produce de manera natural que carece de uno de los dominios de Fab). Específicamente, en el caso de alteración de cadena H, se usaron la cadena H alterada unida al dominio constante pE22Hh, y Kn010G3 (secuencia de aminoácidos de IgG1 que se produce de manera natural desde la posición 216 hasta el extremo C-terminal que tiene las alteraciones C220S, Y349C, T366W y H435R; SEQ ID NO: 56) como cadenas H, y se usó GLS3000 unido en el lado 3' a la cadena kappa como cadena L. En el caso de alteración de cadena L, se usó la cadena L alterada unida en el lado 3' a la cadena kappa como cadena L, y se usaron CE115HA000 unido en el lado 3' a pE22Hh, y Kn010G3 como cadenas H. Se expresaron estas secuencias y se purificaron en células FreeStyle 293 (que emplearon el método del ejemplo de referencia 1).
- 35      40      45      50      [Tabla 3]

(6-3) Evaluación de la unión de anticuerpo con una alteración de aminoácido a CD3

- 5 Cada forma con un aminoácido alterado construida, expresada y purificada en el párrafo (6-2) se evaluó usando un dispositivo Biacore T200 (GE Healthcare Japan Corp.). Se inmovilizó una cantidad apropiada de proteína homodimérica de CD3ε sobre chip de sensor CM4 (GE Healthcare Japan Corp.) mediante el método de acoplamiento de amina. Después, se inyectó el anticuerpo que tenía una concentración apropiada en el mismo como analito y se dejó interaccionar con la proteína homodimérica de CD3ε en el chip de sensor. Después, se regeneró el chip de sensor mediante la inyección de glicina-HCl 10 mmol/l (pH 1,5). El ensayo se realizó a 25°C, y se usó HBS-EP+ (GE Healthcare Japan Corp.) como tampón de corrida. A partir de los resultados del ensayo, se calculó la constante de disociación  $K_D$  (M) usando un modelo de cinética de un único ciclo (1:1 de unión RI= 0) para la cantidad unida y el sensograma obtenido en el ensayo. Se calculó cada parámetro usando el software de evaluación Biacore T200 (GE Healthcare Japan Corp.).  
10

### (6-3-1) Alteración de cadena H

- La tabla 4 muestra los resultados de la razón de la cantidad de cada forma de cadena H alterada unida con respecto a la cantidad del anticuerpo CE115HA000 sin alterar correspondiente unida. Específicamente, cuando la cantidad del anticuerpo que comprende CE115HA000 unida se definió como X y la cantidad de la forma de cadena H con un aminoácido alterado unida se definió como Y, se usó un valor de Z (razón de cantidades unidas) = Y / X. Tal como se muestra en la figura 18, se observó una cantidad unida muy pequeña en el sensograma para Z de menos de 0,8, lo que sugiere la posibilidad de que no pueda calcularse correctamente la constante de disociación  $K_D$  (M). La tabla 5

muestra la razón de constantes de disociación  $K_D$  (M) de cada forma de cadena H alterada con respecto a CE115HA000 (= valor de KD de CE115HA000 / valor de KD de la forma alterada).

- 5 Cuando Z mostrado en la tabla 4 es de 0,8 o más, se considera que la forma alterada conserva la unión con respecto al anticuerpo CE115HA000 sin alterar correspondiente. Por tanto, una biblioteca de anticuerpos diseñada de tal manera que aparecen estos aminoácidos puede servir como biblioteca de Fab doble.

[Tabla 4]

ES 2 989 110 T3

ES 2 989 110 T3

[Tabla 5]

COP1		COP2		COP3	
Sample	Condition	Sample	Condition	Sample	Condition
1	100% DMSO	11	16	18	20
2	100% DMSO	12	17	19	21
3	100% DMSO	13	18	20	22
4	100% DMSO	14	19	21	23
5	100% DMSO	15	20	22	24
6	100% DMSO	16	21	23	25
7	100% DMSO	17	22	24	26
8	100% DMSO	18	23	25	27
9	100% DMSO	19	24	26	28
10	100% DMSO	20	25	27	29
11	100% DMSO	21	26	28	30
12	100% DMSO	22	27	29	31
13	100% DMSO	23	28	30	32
14	100% DMSO	24	29	31	33
15	100% DMSO	25	30	32	34
16	100% DMSO	26	31	33	35
17	100% DMSO	27	32	34	36
18	100% DMSO	28	33	35	37
19	100% DMSO	29	34	36	38
20	100% DMSO	30	35	37	39
21	100% DMSO	31	36	38	40
22	100% DMSO	32	37	39	41
23	100% DMSO	33	38	40	42
24	100% DMSO	34	39	41	43
25	100% DMSO	35	40	42	44
26	100% DMSO	36	41	43	45
27	100% DMSO	37	42	44	46
28	100% DMSO	38	43	45	47
29	100% DMSO	39	44	46	48
30	100% DMSO	40	45	47	49
31	100% DMSO	41	46	48	50
32	100% DMSO	42	47	49	51
33	100% DMSO	43	48	50	52
34	100% DMSO	44	49	51	53
35	100% DMSO	45	50	52	54
36	100% DMSO	46	51	53	55
37	100% DMSO	47	52	54	56
38	100% DMSO	48	53	55	57
39	100% DMSO	49	54	56	58
40	100% DMSO	50	55	57	59
41	100% DMSO	51	56	58	60
42	100% DMSO	52	57	59	61
43	100% DMSO	53	58	60	62
44	100% DMSO	54	59	61	63
45	100% DMSO	55	60	62	64
46	100% DMSO	56	61	63	65
47	100% DMSO	57	62	64	66
48	100% DMSO	58	63	65	67
49	100% DMSO	59	64	66	68
50	100% DMSO	60	65	67	69
51	100% DMSO	61	66	68	70
52	100% DMSO	62	67	69	71
53	100% DMSO	63	68	70	72
54	100% DMSO	64	69	71	73
55	100% DMSO	65	70	72	74
56	100% DMSO	66	71	73	75
57	100% DMSO	67	72	74	76
58	100% DMSO	68	73	75	77
59	100% DMSO	69	74	76	78
60	100% DMSO	70	75	77	79
61	100% DMSO	71	76	78	80
62	100% DMSO	72	77	79	81
63	100% DMSO	73	78	80	82
64	100% DMSO	74	79	81	83
65	100% DMSO	75	80	82	84
66	100% DMSO	76	81	83	85
67	100% DMSO	77	82	84	86
68	100% DMSO	78	83	85	87
69	100% DMSO	79	84	86	88
70	100% DMSO	80	85	87	89
71	100% DMSO	81	86	88	90
72	100% DMSO	82	87	89	91
73	100% DMSO	83	88	90	92
74	100% DMSO	84	89	91	93
75	100% DMSO	85	90	92	94
76	100% DMSO	86	91	93	95
77	100% DMSO	87	92	94	96
78	100% DMSO	88	93	95	97
79	100% DMSO	89	94	96	98
80	100% DMSO	90	95	97	99
81	100% DMSO	91	96	98	100
82	100% DMSO	92	97	99	101
83	100% DMSO	93	98	100	102
84	100% DMSO	94	99	101	103
85	100% DMSO	95	100	102	104
86	100% DMSO	96	101	103	105
87	100% DMSO	97	102	104	106
88	100% DMSO	98	103	105	107
89	100% DMSO	99	104	106	108
90	100% DMSO	100	105	107	109
91	100% DMSO	101	106	108	110
92	100% DMSO	102	107	109	111
93	100% DMSO	103	108	110	112
94	100% DMSO	104	109	111	113
95	100% DMSO	105	110	112	114
96	100% DMSO	106	111	113	115
97	100% DMSO	107	112	114	116
98	100% DMSO	108	113	115	117
99	100% DMSO	109	114	116	118
100	100% DMSO	110	115	117	119
101	100% DMSO	111	116	118	120
102	100% DMSO	112	117	119	121
103	100% DMSO	113	118	120	122
104	100% DMSO	114	119	121	123
105	100% DMSO	115	120	122	124
106	100% DMSO	116	121	123	125
107	100% DMSO	117	122	124	126
108	100% DMSO	118	123	125	127
109	100% DMSO	119	124	126	128
110	100% DMSO	120	125	127	129
111	100% DMSO	121	126	128	130
112	100% DMSO	122	127	129	131
113	100% DMSO	123	128	130	132
114	100% DMSO	124	129	131	133
115	100% DMSO	125	130	132	134
116	100% DMSO	126	131	133	135
117	100% DMSO	127	132	134	136
118	100% DMSO	128	133	135	137
119	100% DMSO	129	134	136	138
120	100% DMSO	130	135	137	139
121	100% DMSO	131	136	138	140
122	100% DMSO	132	137	139	141
123	100% DMSO	133	138	140	142
124	100% DMSO	134	139	141	143
125	100% DMSO	135	140	142	144
126	100% DMSO	136	141	143	145
127	100% DMSO	137	142	144	146
128	100% DMSO	138	143	145	147
129	100% DMSO	139	144	146	148
130	100% DMSO	140	145	147	149
131	100% DMSO	141	146	148	150
132	100% DMSO	142	147	149	151
133	100% DMSO	143	148	150	152
134	100% DMSO	144	149	151	153
135	100% DMSO	145	150	152	154
136	100% DMSO	146	151	153	155
137	100% DMSO	147	152	154	156
138	100% DMSO	148	153	155	157
139	100% DMSO	149	154	156	158
140	100% DMSO	150	155	157	159
141	100% DMSO	151	156	158	160
142	100% DMSO	152	157	159	161
143	100% DMSO	153	158	160	162
144	100% DMSO	154	159	161	163
145	100% DMSO	155	160	162	164
146	100% DMSO	156	161	163	165
147	100% DMSO	157	162	164	166
148	100% DMSO	158	163	165	167
149	100% DMSO	159	164	166	168
150	100% DMSO	160	165	167	169
151	100% DMSO	161	166	168	170
152	100% DMSO	162	167	169	171
153	100% DMSO	163	168	170	172
154	100% DMSO	164	169	171	173
155	100% DMSO	165	170	172	174
156	100% DMSO	166	171	173	175
157	100% DMSO	167	172	174	176
158	100% DMSO	168	173	175	177
159	100% DMSO	169	174	176	178
160	100% DMSO	170	175	177	179
161	100% DMSO	171	176	178	180
162	100% DMSO	172	177	179	181
163	100% DMSO	173	178	180	182
164	100% DMSO	174	179	181	183
165	100% DMSO	175	180	182	184
166	100% DMSO	176	181	183	185
167	100% DMSO	177	182	184	186
168	100% DMSO	178	183	185	187
169	100% DMSO	179	184	186	188
170	100% DMSO	180	185	187	189
171	100% DMSO	181	186	188	190
172	100% DMSO	182	187	189	191
173	100% DMSO	183	188	190	192
174	100% DMSO	184	189	191	193
175	100% DMSO	185	190	192	194
176	100% DMSO	186	191	193	195
177	100% DMSO	187	192	194	196
178	100% DMSO	188	193	195	197
179	100% DMSO	189	194	196	198
180	100% DMSO	190	195	197	199
181	100% DMSO	191	196	198	200
182	100% DMSO	192	197	199	201
183	100% DMSO	193	198	200	202
184	100% DMSO	194	199	201	203
185	100% DMSO	195	200	202	204
186	100% DMSO	196	201	203	205
187	100% DMSO	197	202	204	206
188	100% DMSO	198	203	205	207
189	100% DMSO	199	204	206	208
190	100% DMSO	200	205	207	209
191	100% DMSO	201	206	208	210
192	100% DMSO	202	207	209	211
193	100% DMSO	203	208	210	212
194	100% DMSO	204	209	211	213
195	100% DMSO	205	210	212	214
196	100% DMSO	206	211	213	215
197	100% DMSO	207	212	214	216
198	100% DMSO	208	213	215	217
199	100% DMSO	209	214	216	218
200	100% DMSO	210	215	217	219
201	100% DMSO	211	216	218	220
202	100% DMSO	212	217	219	221
203	100% DMSO	213	218	220	222
204	100% DMSO	214	219	221	223
205	100% DMSO	215	220	222	224
206	100% DMSO	216	221	223	225
207	100% DMSO	217	222	224	226
208	100% DMSO	218	223	225	227
209	100% DMSO	219	224	226	228
210	100% DMSO	220	225	227	229
211	100% DMSO	221	226	228	230
212	100% DMSO	222	227	229	231
213	100% DMSO	223	228	230	232
214	100% DMSO	224	229	231	233
215	100% DMSO	225	230	232	234
216	100% DMSO	226	231	233	235
217	100% DMSO	227	232	234	236
218	100% DMSO	228	233	235	237
219	100% DMSO	229	234	236	238
220	100% DMSO	230	235	237	239
221	100% DMSO	231	236	238	240
222	100% DMSO	232	237</		

### 5 (6-3-2) Alteración de cadena L

La tabla 6 muestra los resultados de la razón de la cantidad de cada forma de cadena L alterada unida con respecto a la cantidad del anticuerpo GLS3000 sin alterar correspondiente unida. Específicamente, cuando la cantidad del anticuerpo que contiene GLS3000 unida se definió como X y la cantidad de la forma de cadena L con un aminoácido

ES 2 989 110 T3

alterado unida se definió como Y, se usó un valor de Z (razón de cantidades unidas) = Y / X. Tal como se muestra en la figura 18, se observó una cantidad unida muy pequeña en el sensograma para Z de menos de 0,8, lo que sugiere la posibilidad de que no pueda calcularse correctamente la constante de disociación  $K_D$  (M). La tabla 7 muestra la razón de constantes de disociación  $K_D$  (M) de cada forma de cadena L alterada con respecto a GLS3000.

5

Cuando Z mostrado en la tabla 6 es de 0,8 o más, se considera que la forma alterada conserva la unión con respecto al anticuerpo GLS3000 sin alterar correspondiente. Por tanto, una biblioteca de anticuerpos diseñada de tal manera que aparecen estos aminoácidos puede servir como biblioteca de Fab doble.

10 [Tabla 6]

[Tabla 7]

15

# ES 2 989 110 T3

DOD10		DOD11		DOD12		DOD13		DOD14		DOD15		DOD16		DOD17		DOD18		DOD19		DOD20		DOD21		DOD22		DOD23		DOD24	
Anticuerpo de la secuencia	Anticuerpo de la secuencia	R	S	G	L	H	V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
Alteración de la secuencia	Alteración de la secuencia	34	25	26	27	270	273	276	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297		
A	A	-	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73			
B	B	9,33	9,33	1,08	1,08	0,69	0,84	28,67	3,21	13,64	3,57	3,01	4,38	1,18	1,18	88,72	0,82	1,18	88,72	0,82	1,18	88,72	0,82	1,18	88,72	0,82	1,18		
C	C	6,84	6,84	6,84	6,84	6,84	6,84	28,75	1,1	42,28	1,04	5,47	1,58	1,58	34,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82	24,82		
D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
E	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
F	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
H	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
I	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
K	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Q	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
T	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Y	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Z	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
A		B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		N			
Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia		Anticuerpo de la secuencia			
Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia		Alteración de la secuencia			
A		B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		N			
B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		N		O			
C		D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		N		O		P			
D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		N		O		P		Q			
E		F		G		H		I		J		K		L		M		N		O		P		Q		R			
F		G		H		I		J		K		L		M		N		O		P		Q		R		S			
G		H		I		J		K		L		M		N		O		P		Q		R		S		T			
H		I		J		K		L		M		N		O		P		Q		R		S		T		U			
I		J		K		L		M		N		O		P		Q		R		S		T		U		V			
J		K		L		M		N		O		P		Q		R		S		T		U		V		W			
K		L		M		N		O		P		Q		R		S		T		U		V		W		X			
L		M		N		O		P		Q		R		S		T		U		V		W		X		Y			
M		N		O		P		Q		R		S		T		U		V		W		X		Y		Z			
N		O		P		Q		R		S		T		U		V		W		X		Y		Z		-			
O		P		Q		R		S		T		U		V		W		X		Y		Z		-		-			
P		Q		R		S		T		U		V		W		X		Y		Z		-		-		-			
Q		R		S		T		U		V																			

# ES 2 989 110 T3

[Tabla 8]

TOMADA		SXR1		SXR2		CIR2	
		V	R	I	K	V	R
Albedo de la estrella	0.18	0.28	0.28	0.39	0.31	0.38	0.38
Albedo de la atmósfera	0.18	0.28	0.28	0.39	0.31	0.38	0.38
A	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11
B	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
C	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
D	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
E	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
F	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
G	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
H	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
I	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57
K	4.37	4.37	4.37	4.37	4.37	4.37	4.37
L	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1
M	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12
N	5.12	5.12	5.12	5.12	5.12	5.12	5.12
P	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55
Q	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55	6.55
R	7.66	7.66	7.66	7.66	7.66	7.66	7.66
S	9.95	9.95	9.95	9.95	9.95	9.95	9.95
T	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32	6.32
U	6.17	6.17	6.17	6.17	6.17	6.17	6.17
V	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94
W	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94
Y	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94
Z	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94	3.94
TOMADA		SXR3		CIR3		FR3	
Albedo de la estrella	0.18	0.28	0.28	0.38	0.38	0.38	0.38
Albedo de la atmósfera	0.18	0.28	0.28	0.38	0.38	0.38	0.38
A	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
B	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
C	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
D	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
E	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
F	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
G	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
H	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
I	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
K	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
L	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
P	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
Q	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
R	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
S	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
T	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
V	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
W	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41
Y	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41	2.41

# ES 2 989 110 T3

[Tabla 9]

Dominio		CDR1												CDR2											
Luminiscencia Kdicit		24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	H	S	I	V	N	R	G	T	Y	L	H	Q	F	P	M	C
Aminoácidos antece de la sustitución		R	S	S	Q	S	Q	S	I	V															
A	2.62	2.23																							
C	2.82	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	
E	2.02	2.22	2.22	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	
F																									
G	1.53																								
H																									
I																									
K																									
L																									
M																									
N																									
P																									
Q	1.26																								
R																									
S	2.65																								
T	1.8	2.7																							
V																									
W																									
Y	1.89																								
Dominio		CDR3												CDR4											
Aminoácidos antece de la sustitución		K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	T	C	G	T	C	G	T	C	G	T	C	G	T	C
A	2.02	3.65																							
C																									
E																									
F																									
G																									
H																									
I																									
K																									
L																									
M																									
N																									
P																									
Q																									
R																									
S																									
T																									
V																									
W																									
Y																									

5

(6-5) Estudio sobre el sitio de inserción y la longitud de péptido para potenciar la diversidad de la biblioteca

10

El ejemplo 5 mostró que puede insertarse un péptido en cada sitio usando una secuencia de GGS sin cancelar la unión a CD3 (CD3ε). Si es posible una extensión de bucle para la biblioteca de Fab doble, la biblioteca resultante puede incluir más tipos de moléculas (o tener una mayor diversidad) y permitir la obtención de dominios de Fab que se unen a diversos segundos antígenos. Por tanto, a la vista de la supuesta reducción de la actividad de unión provocada por la inserción de péptido, se añadió la alteración V11L/D72A/L78I/D101Q para potenciar la actividad de unión frente a CD3ε a la secuencia de CE115HA000, que se unió adicionalmente a pE22Hh. Se preparó una molécula

mediante la inserción del ligador GGS a esta secuencia, como en el ejemplo 5, y se evaluó para determinar su unión a CD3. Se insertó la secuencia GGS entre las posiciones de numeración de Kabat 99 y 100. Se expresó la molécula de anticuerpo como anticuerpo de una rama. Específicamente, se usaron la cadena H que contenía ligador GGS mencionada anteriormente y Kn010G3 (SEQ ID NO: 56) como cadenas H, y se adoptó GLS3000 (SEQ ID NO: 53) unido a la secuencia kappa (SEQ ID NO: 55) como cadena L. Se expresaron estas secuencias y se purificaron según el ejemplo de referencia 1.

5 (6-6) Confirmación de la unión de anticuerpo CE115 con inserción de péptido GGS a CD3

10 La unión del anticuerpo alterado con inserción de péptido GGS a CD3 $\varepsilon$  se confirmó usando un dispositivo Biacore mediante el método descrito en el ejemplo 6. Tal como se muestra en la tabla 10, los resultados demostraron que el ligador GGS puede insertarse en bucles. Particularmente, el ligador GGS pudo insertarse en la región CDR3 de cadena H, lo cual es importante para la unión a antígeno, y se conservó la unión a CD3 $\varepsilon$  como resultado de cualquiera de las inserciones de 3, 6 y 9 aminoácidos. Aunque este estudio se realizó usando el ligador GGS, puede ser aceptable una biblioteca de anticuerpos en la que aparecen diversos aminoácidos distintos de GGS.

15

[Tabla 10]

Secuencia de aminoácidos insertada	CD3_KD [M]
GGS	6,31E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 90)	3,46E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 90)	3,105E-08
GGSGGG (SEQ ID NO: 92)	4,352E-08
GGSGGG (SEQ ID NO: 92)	3,429E-08
GGGGGGGS (SEQ ID NO: 93)	4,129E-08
GGGGGGGS (SEQ ID NO: 93)	3,753E-08
GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 91)	4,39E-08
GGSGGSGGS (SEQ ID NO: 91)	3,537E-08
Sin inserción	6,961E-09
CE115HA000	1,097E-07

20 (6-7) Estudio sobre la inserción para la biblioteca en CDR3 de cadena H usando la secuencia de nucleótidos NNS

El párrafo (6-6) mostró que los 3, 6 o 9 aminoácidos pueden insertarse usando el ligador GGS y se dedujo que puede prepararse una biblioteca que tiene la inserción de 3, 6 o 9 aminoácidos para obtener un anticuerpo que se une al segundo antígeno mediante el uso de un método de obtención de anticuerpo habitual tipificado mediante el método de presentación en fago. Por tanto, se realizó un estudio sobre si la inserción de 6 aminoácidos en CDR3 podía conservar la unión a CD3 aunque aparecieran diversos aminoácidos en el sitio de inserción de 6 aminoácidos usando una secuencia de nucleótidos NNS (que permite que aparezca cualquier tipo de aminoácido). A la vista de la supuesta reducción de la actividad de unión, se diseñaron cebadores usando la secuencia de nucleótidos NNS de tal manera que se insertaron 6 aminoácidos entre las posiciones 99 y 100 (numeración de Kabat) en CDR3 de una secuencia de 30 CE115HA340 (SEQ ID NO: 59) que tenía una actividad de unión a CD3 $\varepsilon$  superior a la de CE115HA000. Se expresó la molécula de anticuerpo como un anticuerpo de una rama. Específicamente, se usaron la cadena H alterada mencionada anteriormente y Kn010G3 (SEQ ID NO: 56) como cadenas H, y se adoptó GLS3000 (SEQ ID NO: 53) unido a la secuencia kappa (SEQ ID NO: 55) como cadena L. Se expresaron estas secuencias y se purificaron según el ejemplo de referencia 1. Se evaluó el anticuerpo alterado obtenido para determinar su unión mediante el método descrito en el párrafo (6-3). Los resultados se muestran en la tabla 11. Los resultados demostraron que la actividad de unión frente a CD3 (CD3 $\varepsilon$ ) se conserva aunque aparezcan diversos aminoácidos en el sitio extendido con los aminoácidos. La tabla 12 muestra resultados de una evaluación adicional de la presencia o ausencia de potenciación en la unión no específica mediante el método descrito en el ejemplo de referencia 2. Como resultado, la unión a ECM se potenciaba si el bucle extendido de CDR3 era rico en aminoácidos que tienen una cadena lateral con carga positiva. 40 Por tanto, se deseaba que no deben aparecer en el bucle tres o más aminoácidos que tienen una cadena lateral con carga positiva.

[Tabla 11]

# ES 2 989 110 T3

VH	CD3- KD[M]	C D E R S G																		
		9			1	0														
CE115HA340	2,0E-08	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	2
CE115HA340	2,7E-08	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A	
NNS6f17	7,4E-08	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f27	3,8E-08	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f29	9,0E-08	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f47	3,1E-08	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f50	7,1E-08	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f51	3,1E-08	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f52	5,2E-08	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f54	2,9E-08	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f55	3,1E-08	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f56	2,1E-08	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f58	4,4E-08	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f59	2,0E-07	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f62	6,1E-08	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f63	6,9E-08	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f64	7,8E-08	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f67	3,6E-08	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f68	4,5E-08	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f71	5,1E-08	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f72	1,5E-07	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f73	2,6E-08	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	

[Tabla 12]

Cadena H Reacción de ECL	Razón	C D E R S G																	
		9			1	0													
CE115HA340	364	448	0,9	V	H	Y	A	A	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A
NNS6f17	403	448	0,9	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.
NNS6f27	3444	448	7,7	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.
NNS6f29	481	448	1,1	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.
NNS6f47	54137	448	210,3	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.
NNS6f50	389	564	0,7	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.
NNS6f51	20148	564	35,7	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.
NNS6f52	790	564	14,	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.
NNS6f54	1824	564	3,2	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.
NNS6f55	14183	564	25,1	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.
NNS6f56	6834	564	11,8	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.
NNS6f58	2703	564	4,8	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.
NNS6f59	388	564	0,7	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.
NNS6f62	654	564	1,0	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.
NNS6f63	624	564	1,1	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.
NNS6f64	603	564	1,1	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.
NNS6f67	1292	564	2,3	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.
NNS6f68	2789	564	4,9	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.
NNS6f71	818	564	1,1	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.
NNS6f72	535	564	0,9	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.
NNS6f73	2193	564	3,9	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.

## (6-7) Diseño y construcción de biblioteca de Fab doble

- 5 Basándose en el estudio descrito en el ejemplo 6, se diseñó una biblioteca de anticuerpos (biblioteca de Fab doble) para obtener un anticuerpo que se une a CD3 y al segundo antígeno de la siguiente manera:
- 10 etapa 1: seleccionar aminoácidos que conservan la capacidad de unirse a CD3 (CD3 $\epsilon$ ) (para garantizar el 80 % o más de la cantidad de CE115HA000 unido a CD3);
- 15 etapa 2: seleccionar aminoácidos que conservan una unión a ECM dentro de 10 veces la de MRA en comparación con antes de la alteración; y
- 20 etapa 3: insertar 6 aminoácidos entre las posiciones 99 y 100 (numeración de Kabat) en CDR3 de cadena H.
- 25 El sitio de unión a antígeno de Fab puede diversificarse simplemente realizando la etapa 1. Por tanto, la biblioteca resultante puede usarse para identificar una molécula de unión a antígeno que se une al segundo antígeno. El sitio de unión a antígeno de Fab puede diversificarse simplemente realizando las etapas 1 y 3. Por tanto, la biblioteca resultante puede usarse para identificar una molécula de unión a antígeno que se une al segundo antígeno. Incluso el diseño de biblioteca sin la etapa 2 permite someter a ensayo una molécula obtenida y evaluarla para determinar la unión a ECM.
- 30 Por tanto, para la biblioteca de Fab doble, secuencias derivadas de CE115HA000 añadiendo la mutación V11L/L78I a FR (entrampado) y diversificando adicionalmente las CDR tal como se muestra en la tabla 13 se usaron como cadenas H, y secuencias derivadas de GLS3000 diversificando las CDR tal como se muestra en la tabla 14 se usaron como cadenas L. Estos fragmentos de biblioteca de anticuerpos pueden sintetizarse mediante un método de síntesis de ADN generalmente conocido por los expertos en la técnica. La biblioteca de Fab doble puede prepararse como (1) una biblioteca en la que las cadenas H se diversifican tal como se muestra en la tabla 13 mientras que las cadenas L están fijas a GLS3000 de secuencia original o la cadena L que tiene unión a CD3 $\epsilon$  potenciada descrita en el ejemplo 6, (2) una biblioteca en la que las cadenas H están fijas a la secuencia original (CE115HA000) o la cadena H que tiene unión a CD3 $\epsilon$  potenciada descrita en el ejemplo 6 mientras que las cadenas L se diversifican tal como se muestra en la tabla 14, y (3) una biblioteca en la que las cadenas H se diversifican tal como se muestra en la tabla 13 mientras que las cadenas L se diversifican tal como se muestra en la tabla 14. Las secuencias de la biblioteca de cadena H derivadas a partir de CE115HA000 añadiendo la mutación V11L/L78I a FR (entrampado) y diversificando adicionalmente las CDR tal como se muestra en la tabla 13 se confiaron a la empresa de síntesis de ADN DNA2.0, Inc. para obtener fragmentos de biblioteca de anticuerpos (fragmentos de ADN). Se insertaron los fragmentos de biblioteca de anticuerpos obtenidos en fagémidos para la presentación en fagos amplificada mediante PCR. Se usó GLS3000 como cadenas L. Se transfirieron los fagémidos construidos para presentación en fagos a *E. coli* mediante electroporación para preparar *E. coli* que albergaba los fragmentos de biblioteca de anticuerpos.
- 35 40 [Tabla 13]

ES 2 989 110 T3

# ES 2 989 110 T3

[Tabla 14]

Dominio	CD3										CD3										FR3		
	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4		
enumeración de Kazai	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	G	K	V	S	K	R	
Áreas de la sustitución	R	S	S	O	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q	K	V	S	R	F	
Biblioteca	A	A	D	D	E	I	L	A	F	I	A	A	G	T	S	A	E	S	A	A	F	E	
	E	P	E	P	P	G	H	H	H	I	G	G	A	P	A	G	T	S	H	N	S	D	
	G	Y			Y				M	M	V	T	Y			H	I	T		N			
	Q					L	Q		V						K	L			S				
	S					M			V						N	M			T				
																		N					
																		P					
																		Q					
																			T				
																		V					
																		Y					

- 5 [Ejemplo 7] Obtención de dominio de Fab que se une a CD3 y a segundo antígeno (IL6R) a partir de la biblioteca de Fab doble

## (7-1) Obtención de dominio de Fab que se une a IL6R humano

Se identificaron dominios de Fab (fragmentos de anticuerpo) que se unen a IL6R humano a partir de la biblioteca de Fab doble diseñada y construida en el ejemplo 6. Se usó IL6R humano marcado con biotina como antígeno y se enriquecieron fragmentos de anticuerpo que tenían la capacidad de unirse a IL6R humano.

Se produjeron fagos a partir de *E. coli* que albergaba los fagémidos construidos para presentación en fagos. Se añadió NaCl 2,5 M/PEG al 10 % a la disolución de cultivo de *E. coli* que había producido fagos, y se diluyó una combinación de fagos así precipitados con TBS para obtener una disolución de biblioteca de fagos. A continuación, se añadió BSA (concentración final: 4 %) a la disolución de biblioteca de fagos. Se realizó el método de cribado con referencia a un método de cribado general usando antígenos inmovilizados sobre perlas magnéticas (J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9; J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203; Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20; y Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). Las perlas magnéticas usadas fueron perlas recubiertas con NeutrAvidin (Sera-Mag SpeedBeads, recubiertas con NeutrAvidin) o perlas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads M-280, estreptavidina).

Especificamente, se añadieron 250 pmol del antígeno marcado con biotina a la disolución de biblioteca de fagos preparada y de ese modo se pusieron en contacto con la disolución de biblioteca de fagos a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras la adición de perlas magnéticas bloqueadas con BSA, se unieron los complejos de antígeno-fago a las perlas magnéticas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavaron las perlas tres veces con TBST (TBS que contenía Tween 20 al 0,1 %; TBS estaba disponible de Takara Bio Inc.) y después se lavaron adicionalmente dos veces con 1 ml de TBS. Tras la adición de 0,5 ml de tripsina 1 mg/ml, se suspendieron las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos, inmediatamente después de lo cual se separaron las perlas usando una plataforma magnética para recuperar una disolución de fagos. Se añadió la disolución de fagos recuperada a 10 ml de una cepa ER2738 de *E. coli* en una fase de crecimiento logarítmico (DO600: 0,4-0,5). Se infectó la cepa de *E. coli* por los fagos mediante el cultivo con centrifugación suave de la cepa a 37°C durante 1 hora. Se inoculó *E. coli* infectada en una placa de 225 mm x 225 mm. A continuación, se recuperaron fagos a partir de la disolución de cultivo de *E. coli* inoculada para preparar una disolución de biblioteca de fagos. Este ciclo, denominado cribado, se repitió varias veces. En la segunda y posteriores rondas de cribado, se usaron 40 pmol del antígeno marcado con biotina. En la cuarta ronda de cribado, se enriquecieron los fagos con capacidad de unión frente a CD3 como índice. Específicamente, se añadieron 250 pmol de antígeno peptídico de CD3ε marcado con biotina (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 60) a la disolución de biblioteca de fagos preparada y de ese modo se pusieron en contacto con la disolución de biblioteca de fagos a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras la adición de perlas magnéticas bloqueadas con BSA, se unieron los complejos de antígeno-fago a las perlas magnéticas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavaron las perlas con 1 ml de TBS que contenía Tween 20 al 0,1 % y TBS. Se suspendieron las perlas complementadas con 0,5 ml de tripsina 1 mg/ml a temperatura ambiente durante 15 minutos, inmediatamente después de lo cual se separaron las perlas usando una plataforma magnética para recuperar una disolución de fagos. Los fagos recuperados a partir de la disolución de fagos tratados con tripsina se añadieron a 10 ml de una cepa ER2738 de *E. coli* en una fase de crecimiento logarítmico (DO600: 0,4-0,7). Se infectó la cepa de *E. coli* por los fagos mediante el cultivo con centrifugación suave de la cepa a 37°C durante 1 hora. Se inoculó *E. coli* infectada en una placa de 225 mm x 225 mm. A continuación, se recuperaron fagos a partir de la disolución de cultivo de *E. coli* inoculada para recuperar una disolución de biblioteca de fagos.

Con el fin de prevenir que una pluralidad de fagos infectaran una *E. coli*, una disolución de biblioteca de fagos preparada a partir de *E. coli* infectada por fagos recuperados mediante la quinta ronda de cribado se diluyó de nuevo 100.000 veces y se infectó *E. coli* por la disolución de fagos resultantes para obtener colonias individuales.

## (7-2) Unión de dominio de Fab presentado por fago a CD3 o IL6R (ELISA de fagos)

Se recuperó un sobrenadante de cultivo que contenía fagos según un método rutinario (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) a partir de cada colonia individual de *E. coli* obtenida mediante el método descrito anteriormente. Tras la adición de BSA (concentración final: 4 %), se sometió el sobrenadante de cultivo que contenía fagos a ELISA mediante los siguientes procedimientos: se recubrió una placa de microtitulación StreptaWell 96 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) durante la noche a 4°C o a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µl de PBS que contenía el antígeno marcado con biotina (péptido de CD3ε biotinilado o IL6R humano biotinilado). Se lavó cada pocillo de la placa con PBST para retirar antígenos no unidos. Después, se bloqueó el pocillo con 250 µl de BSA al 4 %-TBS durante 1 hora o más. Tras la retirada de BSA al 4 %-TBS, se añadió el sobrenadante de cultivo preparado a cada pocillo y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de modo que el anticuerpo presentado en fago se unió al antígeno contenido en cada pocillo. Se lavó cada pocillo con TBST y después se añadieron anticuerpos anti-M13 conjugados con HRP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) diluidos con TBS que contenía BSA (concentración final: 4 %) a cada pocillo. Se incubó la placa durante 1 hora. Despues de lavar con TBST, se añadió disolución individual de TMB (ZYMED Laboratories, Inc.) al pocillo. Se terminó la reacción cromogénica de la disolución en cada pocillo mediante la adición de ácido sulfúrico. Despues, se sometió a ensayo el color desarrollado basándose en la absorbancia a 450 nm. Los resultados se muestran en la figura 19. Se mostró que los clones n.º 50 y n.º 62 tenían actividad de unión frente a CD3ε e IL6R humano. Dicho de otro modo, se seleccionaron satisfactoriamente clones que mostraban

actividad de unión frente al segundo antígeno (en el ejemplo 7, IL6R humano) mediante el uso de la biblioteca de Fab doble. Pueden seleccionarse clones que muestran actividad de unión a partir de un número adicionalmente aumentado de miembros de biblioteca para evaluarse, después convertirse en IgG (las secuencias de VH y VL de cada clon se unen a dominios constantes de cadena H y de cadena L humanos, respectivamente) y evaluarse para determinar su actividad de unión frente a CD3 $\epsilon$  y al segundo antígeno (IL6R humano). Además, puede examinarse si se unen o no a CD3 $\epsilon$  y al segundo antígeno (IL6R humano) al mismo tiempo mediante el método descrito en el ejemplo 3 o 4 o el método de competición. El método de competición muestra que el anticuerpo no se une a CD3 $\epsilon$  y al segundo antígeno al mismo tiempo, por ejemplo, cuando el nivel de su unión a CD3 $\epsilon$  se reduce en presencia del segundo antígeno en comparación con el anticuerpo solo.

[Ejemplo 8] Obtención de dominio de Fab que se une a CD3 y a segundo antígeno (IgA humana) a partir de la biblioteca de Fab doble

(8-1) Obtención de dominio de Fab que se une a IgA humana

Se conoce IgA, que es un isotipo de anticuerpo abundante *in vivo*, como molécula implicada en biofilaxis intestinal o mucosa y también se sabe que se une a Fc $\alpha$ R (receptor de Fc alfa) (J. Pathol. 208: 270-282, 2006).

Se identificaron dominios de Fab (fragmentos de anticuerpo) que se unen a IgA humana a partir de la biblioteca de Fab doble diseñada y construida en el ejemplo 6. Se usó IgA humana marcada con biotina (descrita en el ejemplo de referencia 3) como antígeno y se enriquecieron fragmentos de anticuerpo que tenían la capacidad de unirse a IgA humana.

Se produjeron fagos a partir de *E. coli* que alberga los fagémidos construidos para presentación en fagos. Se añadió NaCl 2,5 M/PEG al 10 % a la disolución de cultivo de *E. coli* que había producido fagos, y se diluyó una combinación de los fagos así precipitados con TBS para obtener una disolución de biblioteca de fagos. A continuación, se añadió BSA (concentración final: 4 %) a la disolución de biblioteca de fagos. Se realizó el método de cribado con referencia a un método de cribado general usando antígenos inmovilizados sobre perlas magnéticas (J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9; J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203; Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20; y Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). Las perlas magnéticas usadas fueron perlas recubiertas con NeutrAvidin (Sera-Mag SpeedBeads, recubiertas con NeutrAvidin) o perlas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads M-280, estreptavidina).

Específicamente, se añadieron 250 pmol del antígeno marcado con biotina a la disolución de biblioteca de fagos preparada y de ese modo se pusieron en contacto con la disolución de biblioteca de fagos a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras la adición de perlas magnéticas bloqueadas con BSA, se unieron los complejos de antígeno-fago a las perlas magnéticas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavaron las perlas tres veces con TBST (TBS que contenía Tween 20 al 0,1 %; TBS estaba disponible de Takara Bio Inc.) y después se lavaron adicionalmente dos veces con 1 ml de TBS. Tras la adición de 0,5 ml de tripsina 1 mg/ml, se suspendieron las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos, inmediatamente después de lo cual se separaron las perlas usando una plataforma magnética para recuperar una disolución de fagos. Se añadió la disolución de fagos recuperada a 10 ml de una cepa ER2738 de *E. coli* en una fase de crecimiento logarítmico (DO600: 0,4-0,5). Se infectó la cepa de *E. coli* por los fagos mediante el cultivo con centrifugación suave de la cepa a 37°C durante 1 hora. Se inoculó *E. coli* infectada en una placa de 225 mm x 225 mm. A continuación, se recuperaron fagos a partir de la disolución de cultivo de *E. coli* inoculada para preparar una disolución de biblioteca de fagos. Este ciclo, denominado cribado, se repitió 4 veces. En la segunda y posteriores rondas de cribado, se usaron 40 pmol de IgA humana.

(8-2) Unión de dominio de Fab presentado por fago a CD3 o a IgA humana

Se recuperó un sobrenadante de cultivo que contenía fagos según un método rutinario (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) a partir de cada colonia individual de *E. coli* obtenida mediante el método descrito anteriormente. Tras la adición de BSA (concentración final: 4 %), se sometió el sobrenadante de cultivo que contenía fagos a ELISA mediante los siguientes procedimientos: se recubrió una placa de microtitulación StreptaWell 96 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) durante la noche a 4°C o a temperatura ambiente durante 1 hora con 100  $\mu$ l de PBS que contenía el antígeno marcado con biotina (péptido de CD3 $\epsilon$  marcado con biotina o IgA humana marcada con biotina; ejemplo de referencia 3). Se lavó cada pocillo de la placa con PBST para retirar antígenos no unidos. Después, se bloqueó el pocillo con 250  $\mu$ l de 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/leche desnatación al 0,02 % durante 1 hora o más. Tras la retirada de 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/leche desnatación al 0,02 %, se añadió el sobrenadante de cultivo preparado a cada pocillo y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de modo que el anticuerpo presentado en fago se unió al antígeno contenido en cada pocillo. Se lavó cada pocillo con 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,01 % y después se añadieron anticuerpos anti-M13 conjugados con HRP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) diluidos con 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/Tween20 al 0,01 % a cada pocillo. Se incubó la placa durante 1 hora. Despues de lavar con TBST, se añadió disolución individual de TMB (ZYMED Laboratories, Inc.) al pocillo. Se terminó la reacción cromogénica de la disolución en cada pocillo mediante la adición de ácido sulfúrico. Despues, se sometió a ensayo el color desarrollado basándose en la absorbancia a 450 nm. Los resultados se muestran en la figura 20. Tal como se muestra en la figura 20, se mostró que algunos clones se unían a CD3 y a IgA humana. Por tanto, se seleccionaron satisfactoriamente clones

que mostraban actividad de unión frente al segundo antígeno (en el ejemplo 8, IgA humana) mediante el uso de la biblioteca de Fab doble.

(8-3) Unión de IgG que tiene el dominio de Fab obtenido a CD3 o a IgA humana

Se amplificó el fragmento de VH de cada clon que se mostró que se unía a CD3 y a IgA humana en el párrafo (8-2) a partir de *E. coli* que tenía la secuencia mediante PCR usando cebadores que se unen específicamente a la cadena H en la biblioteca de Fab doble. Se integró el fragmento de VH amplificado en plásmidos que contenían pE22Hh para la expresión en células de animales mediante el método del ejemplo de referencia 1, y se expresó y se purificó como anticuerpo de una rama, como en el ejemplo 6 (6-2). El nombre de cada clon y SEQ ID NO de su secuencia de cadena H se muestran en la tabla 15. Específicamente, se usaron cada cadena H mostrada en la tabla 15 y Kn010G3 (SEQ ID NO: 56) como cadenas H, y se adoptó GLS3000 (SEQ ID NO: 53) unido a la secuencia kappa (SEQ ID NO: 55) como cadena L. Se expresaron estas secuencias y se purificaron según el ejemplo de referencia 1.

15 [Tabla 15]

Nombre de muestra	SEQ ID NO
IGAR4C09#1	61
IGAR4C12#4	62
IGAR6(2)B02#1	63

20 Se evaluó la molécula de anticuerpo que tenía la región Fab obtenida para determinar su unión a CD3ε y a IgA humana mediante el método de electroquimioluminiscencia (método de ECL). Específicamente, péptido de CD3ε marcado con biotina (descrito en el ejemplo 7) o IgA humana marcada con biotina (ejemplo de referencia 3) diluida con una Disolución de TBST (TBS (fabricado por Takara Bio Inc.) complementado con Tween20 al 0,1 %), cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 2 µg/ml, y anticuerpo anti-IgG humana (Invitrogen Corp., n.º 628400) marcado con sulfo-tag se añadieron, cada uno, a 25 µl/pocillo a placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más mientras se protegía de la luz para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBST que contenía BSA al 0,5 % (denominada disolución de bloqueo) a 150 µl/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250 µl de una disolución de TBS(-). Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 50 µl/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de modo que la disolución de complejo de antígeno biotinilado-anticuerpo-anticuerpo de sulfo-tag de detección se unió mediante el antígeno biotinilado a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBST, y se añadió una disolución de 4 x tampón READ (MSD K.K.) diluida 2 veces con agua a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

35 Los resultados se muestran en la figura 21. Cada uno de los clones que se confirmó que se unían mediante ELISA de fagos se convirtió en IgG, incluyendo también aquellos que contenían algunas mutaciones de aminoácido. Por consiguiente, se mostró que estas secuencias que se confirmó que se unían mediante ELISA de fagos se unían a CD3ε y a IgA humana, incluso en forma de IgG.

40 Estos resultados demostraron que: puede obtenerse un anticuerpo que se une al segundo antígeno a partir de la biblioteca de Fab doble; y pueden enriquecerse clones que se confirma que se unen incluso en forma de IgG que contiene región Fc, aunque solo se enriquecen dominios de Fab en cribado habitual usando una biblioteca de fagos. Por tanto, se concluyó que la biblioteca de Fab doble sirve como biblioteca que permite la obtención de un dominio de Fab que tiene la capacidad de unirse al segundo antígeno al tiempo que conserva la capacidad de unirse a CD3.

45 (8-4) Evaluación de la unión de IgG que tiene un dominio de Fab obtenido a CD3 (CD3ε) y a IgA humana al mismo tiempo

50 En el párrafo (8-3), se mostró que los clones obtenidos a partir de la biblioteca de Fab doble tenían actividad de unión incluso en forma de IgG. A continuación, se evaluó cada IgG obtenida para determinar su unión a CD3 (CD3ε) y a IgA humana al mismo tiempo mediante el método de competición (método de electroquimioluminiscencia (método de ECL)). Puede esperarse que: cuando la IgG se une a CD3 (CD3ε) y a IgA humana al mismo tiempo, la adición de CD3 (CD3ε) a anticuerpos unidos a IgA no provoca ningún cambio en la señal de ECL; y cuando la IgG no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo, la adición de CD3 (CD3ε) reduce la señal de ECL debido a la unión de algunos anticuerpos a CD3 (CD3ε).

55 Específicamente, 25 µl de IgA humana biotinilada diluida con una disolución de TBST, 12,5 µl de cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 1 µg/ml, 12,5 µl de TBST o proteína homodimérica de CD3ε (9,4 pmol/µl) para competición, 60 y 25 µl de anticuerpo anti-IgG humana (Invitrogen Corp., n.º 628400) marcado con sulfo-tag se añadieron a cada

pocillo de placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más mientras se protegía de la luz para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBST que contenía BSA al 0,5 % (denominada disolución de bloqueo; la disolución de TBST era TBS (fabricado por Takara Bio Inc.) complementado con Tween20 al 0,1 %) a 150 µl/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250 µl de una disolución de TBST. Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 50 µl/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de modo que la disolución de complejo de antígeno biotinilado-anticuerpo-anticuerpo de sulfo-tag de detección se unió mediante el antígeno biotinilado a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBST, y se añadió una disolución de 4 x tampón READ (MSD K.K.) diluida 2 veces con agua a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

Los resultados se muestran en la figura 22. Se confirmó que la adición de la proteína homodimérica de CD3ε para competición redujo la señal de ECL en comparación con la adición de TBST. Estos resultados indicaron que la molécula que se une a CD3 y a IgA humana, encontrada en este estudio, es una molécula de Fab doble que no puede unirse a IgA humana en un estado unido con CD3. Los resultados demostraron que puede obtenerse un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse al segundo antígeno a partir de la biblioteca de Fab doble y, entre otras cosas, puede obtenerse como molécula de Fab doble que no puede unirse al segundo antígeno en un estado unido con CD3 (o no puede unirse a CD3 en un estado unido con el segundo antígeno), es decir, no puede unirse a múltiples tipos de antígenos al mismo tiempo.

Resulta evidente para los expertos en la técnica que, siempre que se encuentre una molécula de unión en la evaluación de actividad de unión usando fagos en el párrafo (8-2), puede aumentarse la variedad de secuencia de la molécula de unión aumentando el número de miembros de biblioteca que van a evaluarse. Por tanto, se concluyó que la biblioteca de Fab doble sirve como biblioteca que permite la obtención de un dominio de Fab que tiene la capacidad de unirse al segundo antígeno al tiempo que conserva la capacidad de unirse a CD3. En este ejemplo, se usó la biblioteca de Fab doble diversificada únicamente mediante cadenas H. Un tamaño de biblioteca más grande (también denominado diversidad; lo cual significa que la biblioteca incluye secuencias diversas) permite habitualmente obtener más moléculas de unión a antígeno. Por tanto, también puede usarse una biblioteca de Fab doble diversificada mediante cadenas tanto H como L para obtener moléculas de Fab doble, tal como se muestra en este ejemplo.

Siempre que puedan prepararse moléculas de Fab doble tal como se muestra en el ejemplo 8, puede identificarse Fab o un dominio de unión a antígeno que se une al tercer antígeno mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, un método de hibridoma o un método para seleccionar anticuerpos de unión (o dominios de unión) a partir de bibliotecas de anticuerpos. Un anticuerpo que tiene el dominio de unión a antígeno identificado (por ejemplo, Fab) que se une al tercer antígeno y el dominio de Fab de la molécula de Fab doble puede obtenerse como anticuerpo multiespecífico mediante un método de preparación de anticuerpos multiespecíficos generalmente conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, un método para preparar un anticuerpo que tiene cadenas L comunes y dos cadenas H diferentes (técnica que controla la superficie de contacto de cada dominio en la región Fc), CrossMab o intercambio de ramas de Fab. Dicho de otro modo, siempre que pueda identificarse una molécula de Fab doble, puede obtenerse el anticuerpo multiespecífico deseado según un método generalmente conocido por los expertos en la técnica combinando Fab que se une al tercer antígeno con el Fab doble que se une al primer y segundo antígenos tal como se muestra en el ejemplo 8.

#### 45 (8-5) Molécula de Fab doble frente a CD3/IgA humana

En el ejemplo 8, se mostró que la molécula de Fab doble obtenida se unía a CD3ε y a IgA humana, pero no se unía a CD3ε y a IgA humana al mismo tiempo. Puede añadirse adicionalmente un dominio de unión a antígeno que se une al tercer antígeno a la misma mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica.

En los últimos años, se ha encontrado que una molécula de IgA alterada para unirse a EGFR, un antígeno cancerígeno, induce la muerte celular de células cancerosas que expresan EGFR (J Immunol 2007; 179: 2936- 2943). Como mecanismo, el receptor de IgA, FcαR, se expresa en células polimorfonucleares y se notifica que induce la autofagia de células cancerosas (J Immunol 2011; 187: 726-732). Este ejemplo reveló que puede construirse la molécula de Fab doble que se une a CD3 y a IgA. Pueden esperarse efectos antitumorales mediados por FcαR buscando una molécula que se une a FcαR a través de IgA mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica (por ejemplo, ELISA o el método de ECL). Dicho de otro modo, este Fab doble puede inducir tanto actividad citotóxica mediada por células T mediante unión a CD3ε como actividad citotóxica mediada por células que expresan FcαR mediante unión a IgA frente a células que expresan un tercer antígeno arbitrario y puede esperarse que produzca una fuerte actividad citotóxica.

[Ejemplo 9] Obtención de dominio de Fab que se une a CD3 y a segundo antígeno (CD154 humano) a partir de la biblioteca de Fab doble

## (9-1) Obtención de dominio de Fab que se une a CD154 humano

Se identificaron dominios de Fab (fragmentos de anticuerpo) que se unen a CD154 humano a partir de la biblioteca de Fab doble diseñada y construida en el ejemplo 6. Se enriquecieron fragmentos de anticuerpo que tienen la capacidad de unirse a CD154 humano usando CD154 humano marcado con biotina como antígeno.

Se produjeron fagos a partir de *E. coli* que alberga los fagémidos construidos para presentación en fagos. Se añadió NaCl 2,5 M/PEG al 10 % a la disolución de cultivo de *E. coli* que había producido fagos, y se diluyó una combinación de los fagos así precipitados con TBS para obtener una disolución de biblioteca de fagos. A continuación, se añadió 10 BSA (concentración final: 4 %) a la disolución de biblioteca de fagos. Se realizó el método de cribado con referencia a un método de cribado general usando antígenos inmovilizados sobre perlas magnéticas (J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9; J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203; Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20; y Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). Las perlas magnéticas usadas fueron perlas recubiertas con NeutrAvidin (Sera-Mag SpeedBeads, recubiertas con NeutrAvidin) o perlas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads M-280, estreptavidina).

15 Específicamente, se añadieron 250 pmol del antígeno marcado con biotina a la disolución de biblioteca de fagos preparada y de ese modo se pusieron en contacto con la disolución de biblioteca de fagos a temperatura ambiente durante 60 minutos. Tras la adición de perlas magnéticas bloqueadas con BSA, se unieron los complejos de antígeno-fago a las perlas magnéticas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavaron las perlas tres veces con TBST (TBS que contenía Tween 20 al 0,1 %; TBS estaba disponible de Takara Bio Inc.) y después se lavaron adicionalmente dos veces con 1 ml de TBS. Tras la adición de 0,5 ml de tripsina 1 mg/ml, se suspendieron las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos, inmediatamente después de lo cual se separaron las perlas usando una plataforma magnética para recuperar una disolución de fagos. Se añadió la disolución de fagos recuperada a 10 ml de una cepa ER2738 de *E. coli* en una fase de crecimiento logarítmico (DO600: 0,4-0,5). Se infectó la cepa de *E. coli* por los fagos mediante el cultivo con centrifugación suave de la cepa a 37°C durante 1 hora. Se inoculó *E. coli* infectada en una placa de 225 mm x 225 mm. A continuación, se recuperaron fagos a partir de la disolución de cultivo de *E. coli* inoculada para preparar una disolución de biblioteca de fagos. Este ciclo, denominado cribado, se repitió 5 veces. En la segunda y posteriores rondas de cribado, se usaron 40 pmol de CD154 humano.

## 30 (9-2) Unión de dominio de Fab presentado por fago a CD3 o a CD154 humano

Se recuperó un sobrenadante de cultivo que contenía fagos según un método rutinario (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) a partir de cada colonia individual de *E. coli* obtenida mediante el método descrito anteriormente. Tras la adición de BSA (concentración final: 4 %), se sometió el sobrenadante de cultivo que contenía fagos a ELISA mediante los siguientes procedimientos: se recubrió una placa de microtitulación StreptaWell 96 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) durante la noche a 4°C o a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µl de PBS que contenía el antígeno marcado con biotina (péptido de CD3ε marcado con biotina o CD154 marcado con biotina). Se lavó cada pocillo de la placa con PBST para retirar antígenos no unidos. Despues, se bloqueó el pocillo con 250 µl de 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/leche desnatada al 0,02 % durante 1 hora o más. Tras la retirada de 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/leche desnatada al 0,02 %, se añadió el sobrenadante de cultivo preparado a cada pocillo y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de modo que el anticuerpo presentado en fago se unió al antígeno contenido en cada pocillo. Se lavó cada pocillo con 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,01 % y después se añadieron anticuerpos anti-M13 conjugados con HRP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) diluidos con 0,1 x TBS/NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,01 % a cada pocillo. Se incubó la placa durante 1 hora. Despues de lavar con TBST, se añadió disolución individual de TMB (ZYMED Laboratories, Inc.) al pocillo. Se terminó la reacción cromogénica de la disolución en cada pocillo mediante la adición de ácido sulfúrico. Despues, se sometió a ensayo el color desarrollado basándose en la absorbancia a 450 nm. Los resultados se muestran en la figura 23. Tal como se muestra en la figura 23, se mostró que algunos clones se unían a CD3 y a CD154. Por tanto, se seleccionaron satisfactoriamente clones que mostraban actividad de unión frente al segundo antígeno (en el ejemplo 9, CD154 humano) mediante el uso de la biblioteca de Fab doble. Tal como se muestra en los ejemplos 7, 8 y 9, pueden obtenerse dominios de Fab de unión para 3 antígenos diferentes, lo que indica que la biblioteca de Fab doble funciona como una biblioteca para obtener una molécula que se une al segundo antígeno.

## 55 (9-3) Unión de IgG que tiene el dominio de Fab obtenido a CD3 o a CD154 humano

Se amplificó el fragmento de VH de cada clon que se mostró que se unía a CD3 y a CD154 humano en el párrafo (9-2) a partir de *E. coli* que tenía la secuencia mediante PCR usando cebadores que se unen específicamente a la cadena H en la biblioteca de Fab doble. Se integró el fragmento de VH amplificado en plásmidos que contenían pE22Hh para la expresión en células de animales mediante el método del ejemplo de referencia 1, y se expresó y se purificó como anticuerpo de una rama, como en el ejemplo 6(6-2). El nombre de cada secuencia obtenida y SEQ ID NO de su secuencia de cadena H se muestran en la tabla 16. Específicamente, se usaron cada cadena H mostrada en la tabla 16 y Kn010G3 (SEQ ID NO: 56) como cadenas H, y se adoptó GLS3000 (SEQ ID NO: 53) unido a la secuencia kappa (SEQ ID NO: 55) como cadena L. Se expresaron estas secuencias y se purificaron según el ejemplo de referencia 1.

Nombre de muestra	SEQ ID NO	Nombre de muestra	SEQ ID NO
154R3A01#1	64	154R4B07#1	72
154R3A01#2	65	154R4F08#1	73
154R3A01#3	66	154R5A02#1	74
154R3A01#4	67	154R5A02#2	75
154R3B01#1	68	154R5F08#1	76
154R3F02#2	69	154R5F08#3	77
154R4B03#1	70	154R5E11#3	78
154R4B03#4	71		

Se evaluó la molécula de anticuerpo que tenía la región Fab que se mostró que se unía a CD3 y a CD154 humano mediante ELISA de fagos en el párrafo (9-2) para determinar su unión a CD3 y a CD154 humano mediante el método de electroquimioluminiscencia (método de ECL). Específicamente, 25 µl de CD3 biotinilado o CD154 humano

5 biotinilado diluido con una disolución de TBST, 25 µl de cada disolución de anticuerpo ajustada hasta 2 µg/ml, y 25 µl de anticuerpo anti-IgG humana (Invitrogen Corp., n.º 628400) marcado con sulfo-tag se añadieron a cada pocillo de placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más mientras se protegía de la luz para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBST que contenía BSA al 0,5 % (denominada disolución de bloqueo; la 10 disolución de TBST era TBS (fabricado por Takara Bio Inc.) complementado con Tween20 al 0,1 %) a 150 µl/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250 µl de una disolución de TBST. Se añadió la disolución 15 de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 50 µl/pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora de modo que la disolución de complejo de antígeno biotinilado-anticuerpo-anticuerpo de sulfo-tag de detección se unió mediante el antígeno biotinilado a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBST, y se añadió una disolución de 4 x tampón READ (MSD K.K.) diluida 2 veces con agua a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

20 Los resultados se muestran en la figura 24. Cada uno de los clones que se confirmó que se unían mediante ELISA de fagos se convirtió en IgG, incluyendo también aquellos que contenían algunas mutaciones de aminoácido. Por consiguiente, se mostró que estas secuencias que se confirmó que se unían mediante ELISA de fagos se unían a CD3ε y a CD154 humano, incluso en forma de IgG.

25 Estos resultados demostraron que: puede obtenerse un anticuerpo que se une al segundo antígeno a partir de la biblioteca de Fab doble; y pueden enriquecerse clones que se confirma que se unen no solo para IgA humana sino también para CD154 humano incluso en forma de IgG que contiene región Fc, aunque solo se enriquecen dominios de Fab en cribado habitual usando una biblioteca de fagos. Por tanto, se concluyó que la biblioteca de Fab doble sirve como biblioteca que permite la obtención de un dominio de Fab que tiene la capacidad de unirse al segundo antígeno 30 al tiempo que conserva la capacidad de unirse a CD3.

(9-4) Evaluación de la unión de IgG que tiene el dominio de Fab obtenido a CD3ε y a CD154 humano al mismo tiempo

35 En el párrafo (9-3), se mostró que los clones obtenidos a partir de la biblioteca de Fab doble tenían actividad de unión incluso en forma de IgG. A continuación, se evaluó cada IgG obtenida para determinar su unión a CD3 y a CD154 humano al mismo tiempo mediante el método de competición (método de electroquimioluminiscencia (método de ECL)). Puede esperarse que: cuando la IgG se une a CD3 y a CD154 humano al mismo tiempo, la adición de CD3 a 40 anticuerpos unido a CD154 no provoca ningún cambio en la señal de ECL; y cuando la IgG no puede unirse a estos antígenos al mismo tiempo, la adición de CD3 reduce la señal de ECL debido a la unión de algunos anticuerpos a CD3.

Específicamente, 25 µl de CD154 humano biotinilado diluido con una disolución de TBST, 12,5 µl de cada disolución 45 de anticuerpo ajustada hasta 1 µg/ml, 12,5 µl de TBST o proteína homodimérica de CD3ε (9,4 pmol/µl) para competición, y 25 µl de anticuerpo anti-IgG humana (Invitrogen Corp., n.º 628400) marcado con sulfo-tag se añadieron a cada pocillo de placas redondas de 96 pocillos Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (Nunc) y se mezclaron, y después se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más mientras se protegía de la luz para formar un complejo de anticuerpo-antígeno. Se añadió una disolución de TBST que contenía BSA al 0,5 % (denominada disolución de bloqueo; la disolución de TBST era TBS (fabricado por Takara Bio Inc.) complementado con el Tween20 al 0,1 %) a 150 µl/pocillo a una placa de estreptavidina (MSD K.K.) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora o más. Tras retirar la disolución de bloqueo, se lavó cada pocillo tres veces con 250 µl de una disolución de TBST. Se añadió la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno a la misma a 50 µl/pocillo y se incubó la placa a temperatura 50 ambiente durante 1 hora de modo que la disolución de complejo de antígeno biotinilado-anticuerpo-anticuerpo de sulfo-tag de detección se unió mediante el antígeno biotinilado a la placa de estreptavidina. Tras retirar la disolución de complejo de anticuerpo-antígeno, se lavó cada pocillo tres veces con una disolución de TBST, y se añadió una disolución de 4 x tampón READ (MSD K.K.) diluida 2 veces con agua a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la 55 disolución de

detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

Los resultados se muestran en la figura 25. Se confirmó que la adición de la proteína homodimérica de CD3 $\epsilon$  para competición reducía la señal de ECL en comparación con la adición de TBST. Estos resultados indicaron que la molécula que se une a CD3 $\epsilon$  y a CD154 humano, encontrada en este estudio, es una molécula de Fab doble que no puede unirse a CD154 humano en un estado unido con CD3. Los resultados demostraron que puede obtenerse un anticuerpo que se une al segundo antígeno a partir de la biblioteca de Fab doble y, entre otras cosas, puede obtenerse como una molécula de Fab doble que no puede unirse al segundo antígeno en un estado unido con CD3 (o no puede unirse a CD3 en un estado unido con el segundo antígeno), es decir, no puede unirse a múltiples tipos de antígenos al mismo tiempo.

Resulta evidente para los expertos en la técnica que, siempre que se encuentre una molécula de unión en la evaluación de actividad de unión usando fagos en el párrafo (9-2), puede aumentarse la variedad de secuencia de la molécula de unión aumentando el número de miembros de biblioteca que van a evaluarse. Por tanto, se concluyó que la biblioteca de Fab doble sirve como biblioteca que permite la obtención de un dominio de Fab que tiene la capacidad de unirse al segundo antígeno al tiempo que conserva la capacidad de unirse a CD3. En este ejemplo, se usó la biblioteca de Fab doble diversificada únicamente mediante cadenas H. Un tamaño de biblioteca más grande (también denominado diversidad; lo cual significa que la biblioteca incluye secuencias diversas) habitualmente permite obtener más moléculas de unión a antígeno. Por tanto, también puede usarse una biblioteca de Fab doble diversificada mediante cadenas tanto H como L para obtener moléculas de Fab doble, tal como se muestra en este ejemplo.

Siempre que puedan prepararse moléculas de Fab doble tal como se muestra en el ejemplo 9, puede identificarse Fab o un dominio de unión a antígeno que se une al tercer antígeno mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, un método de hibridoma o un método para seleccionar anticuerpos de unión o dominios de unión a antígeno a partir de bibliotecas de anticuerpos. Un anticuerpo que tiene el dominio de unión a antígeno identificado (por ejemplo, Fab) que se une al tercer antígeno y el dominio de Fab de la molécula de Fab doble puede obtenerse como anticuerpo multiespecífico mediante un método de preparación de anticuerpos multiespecíficos generalmente conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, un método para preparar un anticuerpo que tiene cadenas L comunes y dos cadenas H diferentes (técnica que controla la superficie de contacto de cada dominio en la región Fc), CrossMab o intercambio de ramas de Fab. Dicho de otro modo, siempre que pueda identificarse una molécula de Fab doble, puede obtenerse el anticuerpo multiespecífico deseado según un método generalmente conocido por los expertos en la técnica combinando Fab que se une al tercer antígeno con el Fab doble que se une al primer y segundo antígenos tal como se muestra en el ejemplo 9. Estos ejemplos mostraron que puede obtenerse una molécula que se une a CD3 $\epsilon$  y al segundo antígeno mediante la adaptación de la biblioteca de Fab doble para muchos tipos de antígenos, y además demostraron que la molécula que puede obtenerse tal como se describe en el ejemplo 8 o 9 se une al primer antígeno (CD3 $\epsilon$ ) y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo. Tal como se mencionó anteriormente, puede identificarse Fab que se une al tercer antígeno mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por tanto, el anticuerpo deseado descrito en el ejemplo 1 puede obtenerse usando la biblioteca de Fab doble.

#### 40 (9-5) Molécula de Fab doble frente a CD3/CD154 humano

En el ejemplo 9, se mostró que la molécula de Fab doble obtenida se unía a CD3 $\epsilon$  y a CD154 humano, pero no se unía a CD3 $\epsilon$  y CD154 humano al mismo tiempo. Puede añadirse adicionalmente un dominio de unión a antígeno que se une al tercer antígeno a la misma mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica.

En los últimos años, se ha encontrado que un anticuerpo agonista de un receptor de CD154, CD40, potencia la actividad antitumoral en un método de transferir células T sensibles a antígeno cancerígeno (J Immunother., abril de 2012; 35 (3): 276-82). Este ejemplo reveló que puede construirse la molécula de Fab doble que se une a CD3 y a CD154. Pueden esperarse efectos antitumorales mediados por CD40 seleccionando un anticuerpo que muestra actividad agonista frente a CD40 a través de CD154. Dicho de otro modo, puede esperarse que este Fab doble tenga actividad citotóxica mediada por células T mediante unión a CD3 $\epsilon$  frente a células que expresan un tercer antígeno arbitrario y que potencie los efectos antitumorales mediados por señales agonistas de CD40 mediante unión a CD154.

#### 55 [Ejemplos de referencia]

##### [Ejemplo de referencia 1] Preparación de vector de expresión de anticuerpo y expresión y purificación de anticuerpo

Se llevó a cabo una sustitución de aminoácido mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica usando kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene Corp.), PCR o kit de clonación mediante PCR In fusion Advantage (Takara Bio Inc.), etc., para construir vectores de expresión. Se secuenciaron los vectores de expresión obtenidos mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Se transfirieron de manera transitoria los plásmidos preparados a línea HEK293H derivada de células cancerosas de riñón embrionario humano (Invitrogen Corp.) o células FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) para expresar anticuerpos. Se purificó cada anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo obtenido mediante un método generalmente conocido por los expertos

en la técnica usando rProtein A Sepharose(TM) Fast Flow (GE Healthcare Japan Corp.). En cuanto a la concentración del anticuerpo purificado, se midió la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro y se calculó la concentración de anticuerpo mediante el uso de un coeficiente de extinción calculado a partir del valor obtenido mediante PACE (Protein Science 1995; 4: 2411-2423).

5 [Ejemplo de referencia 2] Evaluación de la unión de anticuerpo a ECM (matriz extracelular)

Se evaluó la unión de cada anticuerpo a ECM (matriz extracelular) mediante los siguientes procedimientos con referencia al documento WO2012093704 A1: se diluyó rojo fenol de ECM libre (BD Matrigel n.º 356237) hasta 2 mg/ml con TBS y se añadió gota a gota a 5 µl/pocillo al centro de cada pocillo de una placa para ensayo de ECL (L15XB-3, MSD K.K., alta unión) enfriada en hielo. Después, se tapó la placa con un sello para placa y se dejó reposar durante la noche a 4°C. Se llevó la placa con ECM inmovilizada hasta temperatura ambiente. Se añadió un tampón de bloqueo de ECL (PBS complementado con BSA al 0,5 % y Tween 20 al 0,05 %) a la misma a 150 µl/pocillo y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante 2 horas o más o durante la noche a 4°C. A continuación, se diluyó cada muestra de anticuerpo hasta 9 µg/ml con PBS-T (PBS complementado con Tween 20 al 0,05 %). Se diluyó un anticuerpo secundario hasta 2 µg/ml con ECLDB (PBS complementado con BSA al 0,1 % y Tween 20 al 0,01 %). Se añadieron 20 µl de la disolución de anticuerpo y 30 µl de la disolución de anticuerpo secundario a cada pocillo de una placa de fondo redondo que contenía ECLDB dispensado a 10 µl/pocillo y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora mientras se protegía de la luz. Se retiró el tampón de bloqueo de ECL invirtiendo la placa de ECM que contenía el tampón de bloqueo de ECL. A esta placa, se le añadió una disolución mixta del anticuerpo y anticuerpo secundario anteriormente mencionados a 50 µl/pocillo. Después, se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora mientras se protegía de la luz. Se retiró la muestra invirtiendo la placa y después se añadió tampón READ (MSD K.K.) a la misma a 150 µl/pocillo, seguido por la detección de la señal de luminiscencia de sulfo-tag usando un dispositivo Sector Imager 2400 (MSD K.K.).

25 [Ejemplo de referencia 3] Preparación de IgA humana

Se usó una región Fc en una secuencia de IgA humana que se produce de manera natural como IgA humana (Fc de IgA humana). Con el fin de biotinilar el extremo C-terminal de la Fc de IgA humana, se unió un fragmento génico, que codifica para una secuencia específica (secuencia AviTag, SEQ ID NO: 79) para la biotinilación mediada por biotina ligasa, mediante un ligador a un fragmento génico que codifica para la de IgA humana. Se integraron el fragmento génico que codifica para una proteína que contiene la Fc de IgA humana y la secuencia AviTag unidas (SEQ ID NO: 80) en vectores para la expresión en células de animales, y se transfirieron los plásmido vectores construidos a células FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) usando 293Fectin (Invitrogen Corp.). En esta operación, se cotransfectaron las células con el vector de expresión y un gen que codifica para EBNA1 (SEQ ID NO: 81) y un gen que codifica para biotina ligasa (BirA, SEQ ID NO: 82), y se añadió adicionalmente biotina con el fin de biotinilar la Fc de IgA humana. Se cultivaron las células transfected según los procedimientos mencionados anteriormente a 37°C durante 6 días en un entorno de CO<sub>2</sub> al 8 % de modo que se secretó la proteína de interés en el sobrenadante de cultivo.

40 Se filtró la disolución de cultivo celular que contenía la Fc de IgA humana de interés a través de un filtro de parte superior de botella de 0,22 µm para obtener un sobrenadante de cultivo. Se aplicó el sobrenadante de cultivo diluido con Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) a HiTrap Q HP (GE Healthcare Japan Corp.) equilibrada con Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), seguido por la elución de la Fc de IgA humana de interés con el gradiente de concentración de NaCl. A continuación, se aplicó el eluato de HiTrap Q HP diluido con Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) a una columna de avidina SoftLink (Promega Corp.) equilibrada con Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), seguida por la elución de la Fc de IgA humana de interés con biotina 5 mM, NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Después, se retiraron los compuestos asociados como impurezas indeseadas mediante cromatografía de filtración en gel usando Superdex 200 (GE Healthcare Japan Corp.) para obtener Fc de IgA humana purificada con el tampón sustituido por histidina-HCl 20 mM y NaCl 150 mM (pH 6,0).

## 50 Aplicabilidad industrial

La presente invención puede potenciar la actividad producida por moléculas de unión a antígeno y proporciona anticuerpos que pueden evitar la reticulación entre diferentes células resultante de la unión a antígenos expresados en las diferentes células, lo cual se considera que es responsable de reacciones adversas, y es adecuado como fármaco.

## **REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que comprende:

5           (i) una región variable de anticuerpo que puede unirse a un primer antígeno y a un segundo antígeno diferente del primer antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo, en el que uno cualquiera del primer antígeno y el segundo antígeno es CD3, y el otro antígeno es Fc<sub>γ</sub>R, TLR, lectina, IgA, una molécula de punto de control inmunitario, una molécula de la superfamilia de TNF, molécula de la superfamilia de TNFR o una molécula de receptor de NK; y

10           (ii) una región variable de anticuerpo que se une a un tercer antígeno, en el que el tercer antígeno es un antígeno específico de célula tumoral que es diferente del primer antígeno y el segundo antígeno,

15           en el que las regiones variables de anticuerpo comprenden un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH);

20           en el que la región variable de anticuerpo que puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno es una región variable que comprende una alteración de al menos un aminoácido en una CDR1, CDR2, CDR3 o FR3 de la región variable, en el que la alteración es una inserción de una secuencia de aminoácidos que se une al segundo antígeno en la secuencia de aminoácidos de una región variable que se une al primer antígeno,

25           en el que el número de aminoácidos que van a insertarse es de 1 a 25;

30           y en el que dicho anticuerpo no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo.

2. El anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende además una región Fc de anticuerpo.

35           3. El anticuerpo según la reivindicación 2, en el que la región Fc es una región Fc que tiene actividad de unión reducida frente a Fc<sub>γ</sub>R en comparación con la región Fc de un anticuerpo de IgG1 humana que se produce de manera natural.

40           4. El anticuerpo según la reivindicación 3, en el que la región Fc de la IgG1 humana que se produce de manera natural tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

45           5. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la inserción está en un bucle; o en el que la inserción está en uno o más aminoácidos seleccionados de las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en un dominio variable de cadena H de anticuerpo, y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en un dominio variable de cadena L.

50           6. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.

55           7. Un método para producir un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el método las etapas (i) a (iv):

60           (i) preparar una biblioteca de moléculas de unión a antígeno con al menos un aminoácido alterado en sus regiones variables de anticuerpo que se unen, cada una, al primer antígeno o al segundo antígeno, en el que las regiones variables alteradas difieren en al menos un aminoácido una de otra;

65           (ii) seleccionar, de la biblioteca preparada, una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable que tiene actividad de unión frente al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo;

70           (iii) cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica para la región variable de la molécula de unión a antígeno seleccionada en la etapa (ii), y un ácido nucleico que codifica para una región variable de una molécula de unión a antígeno que se une al tercer antígeno, para expresar una molécula de unión a antígeno que comprende la región variable de anticuerpo que puede unirse al primer antígeno y al segundo antígeno, pero no se une al primer antígeno y al segundo antígeno al mismo tiempo, y la región variable que se une al tercer antígeno; y

75           (iv) recuperar la molécula de unión a antígeno a partir de los cultivos de célula huésped.

80           8. El método según la reivindicación 7, en el que la alteración es una alteración de un aminoácido en un bucle; o en el que la alteración es una alteración de al menos un aminoácido seleccionado de las posiciones de numeración de Kabat de 31 a 35, de 50 a 65, de 71 a 74 y de 95 a 102 en un dominio variable de cadena H de anticuerpo, y las posiciones de numeración de Kabat de 24 a 34, de 50 a 56 y de 89 a 97 en un dominio variable de cadena L.

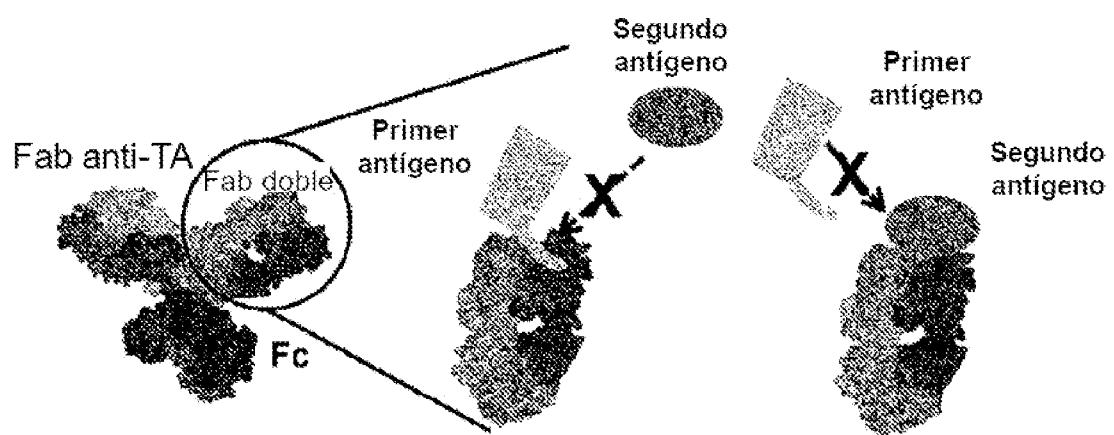


FIG. 1

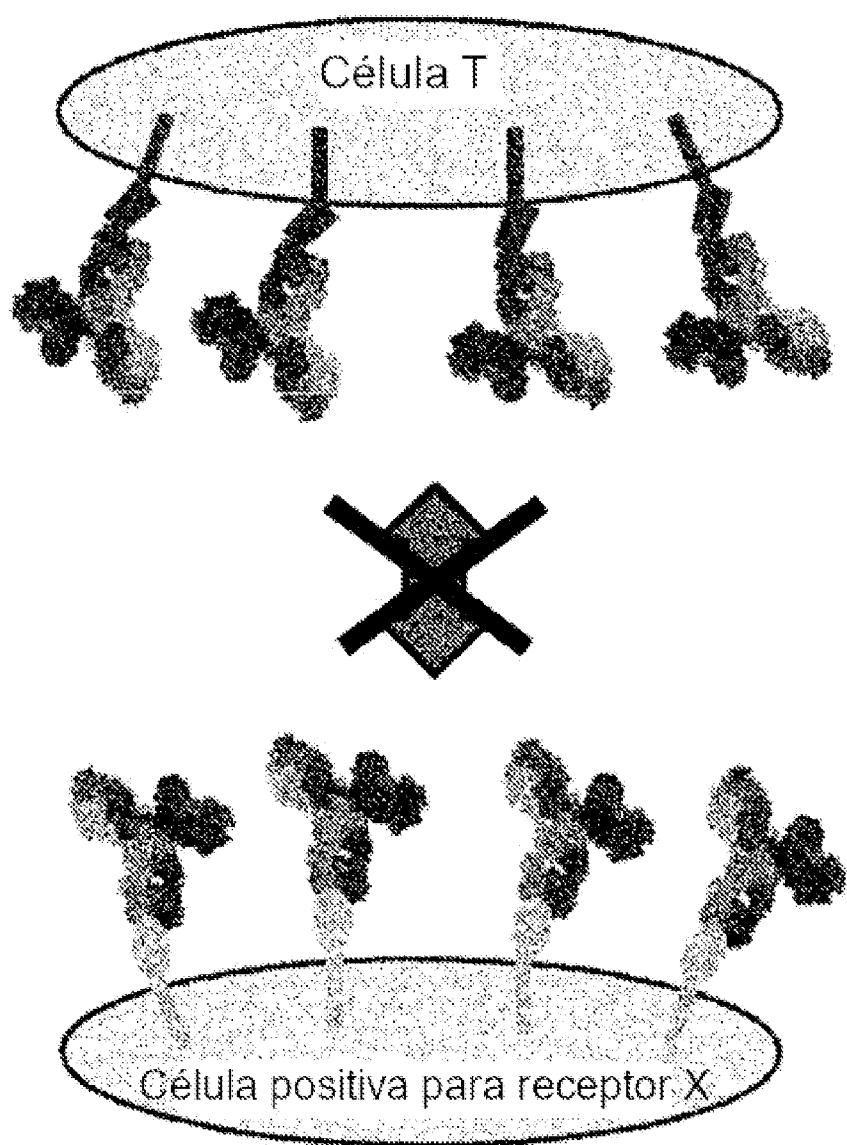


FIG. 2

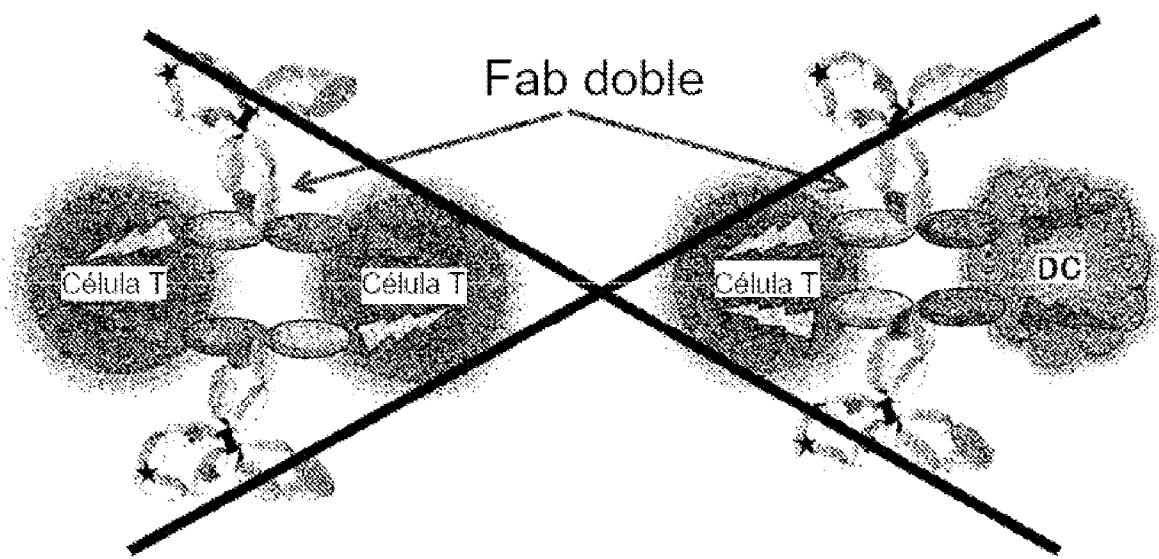
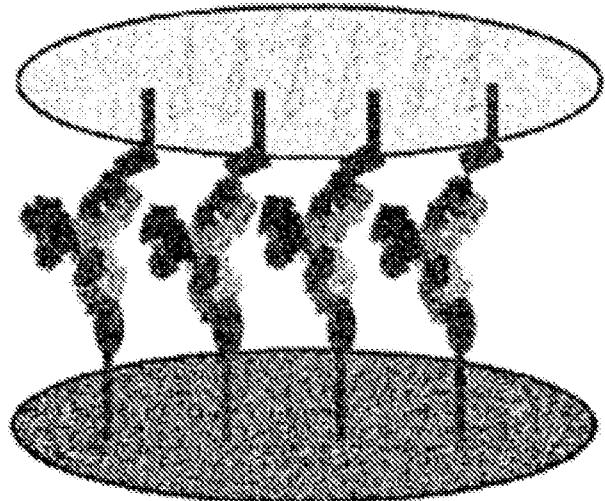


FIG. 3

Célula T (célula positiva para CD3)



Célula cancerosa

FIG. 4

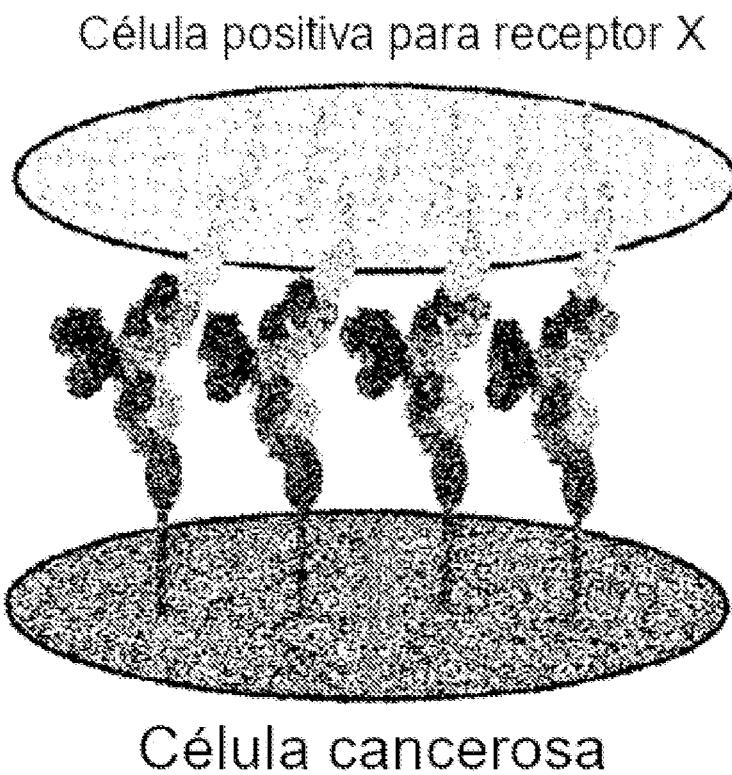


FIG. 5

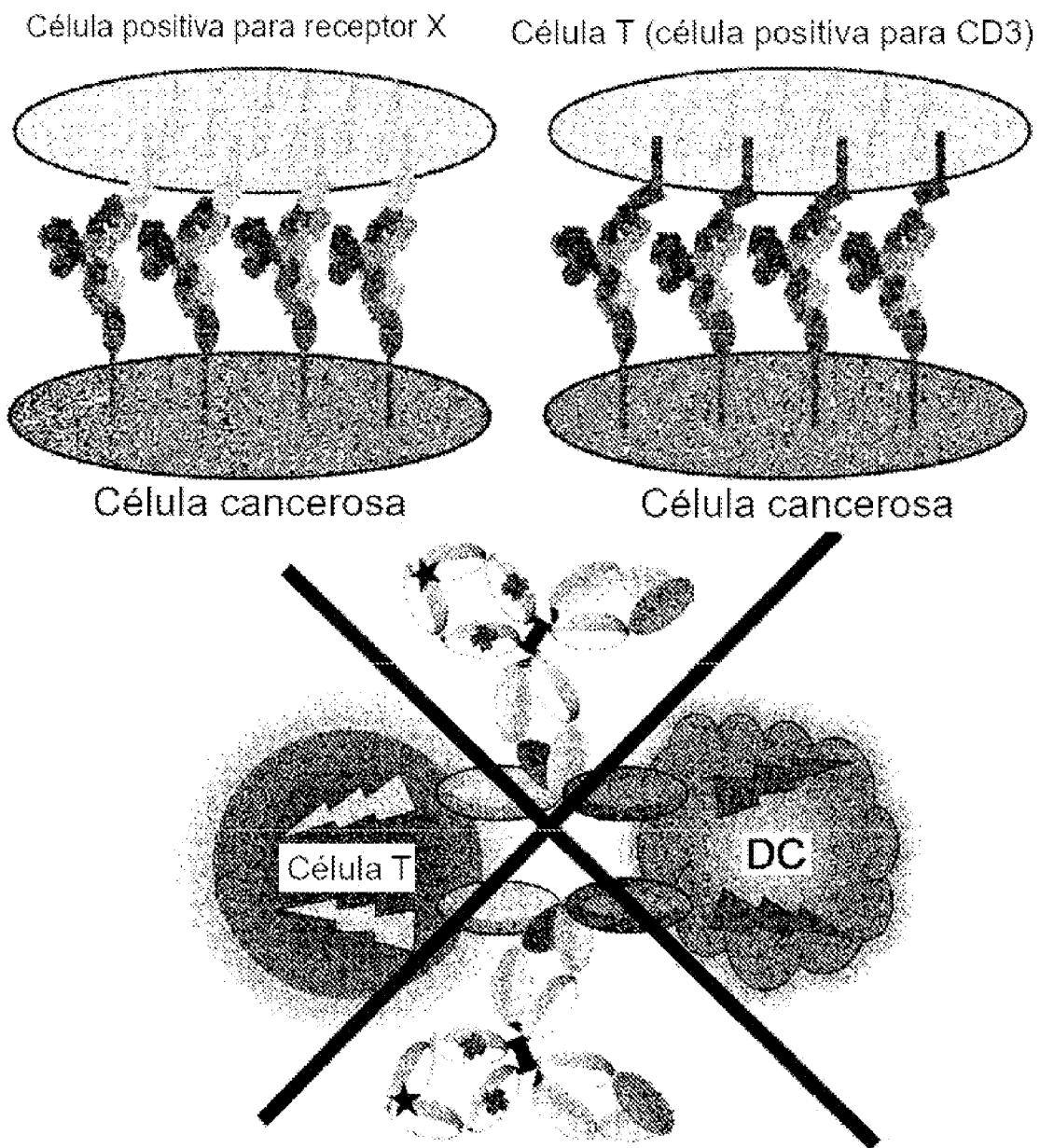


FIG. 6

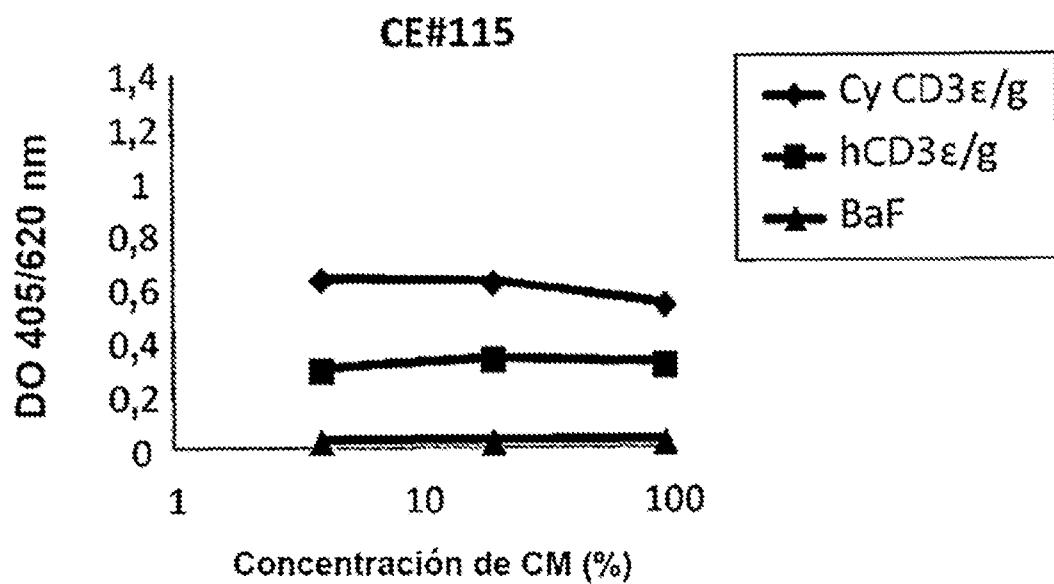


FIG. 7

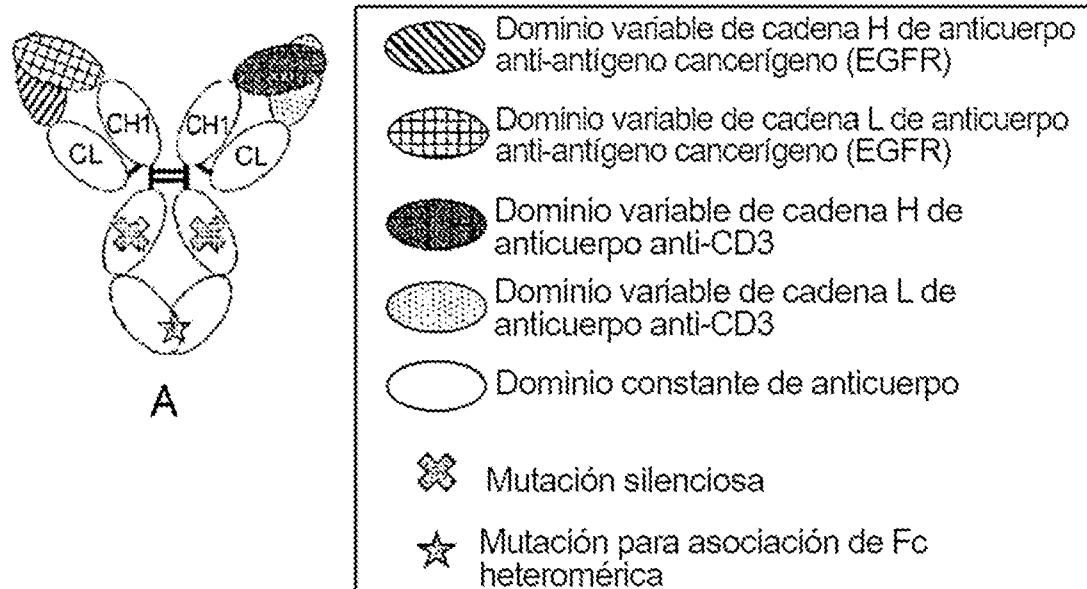


FIG. 8

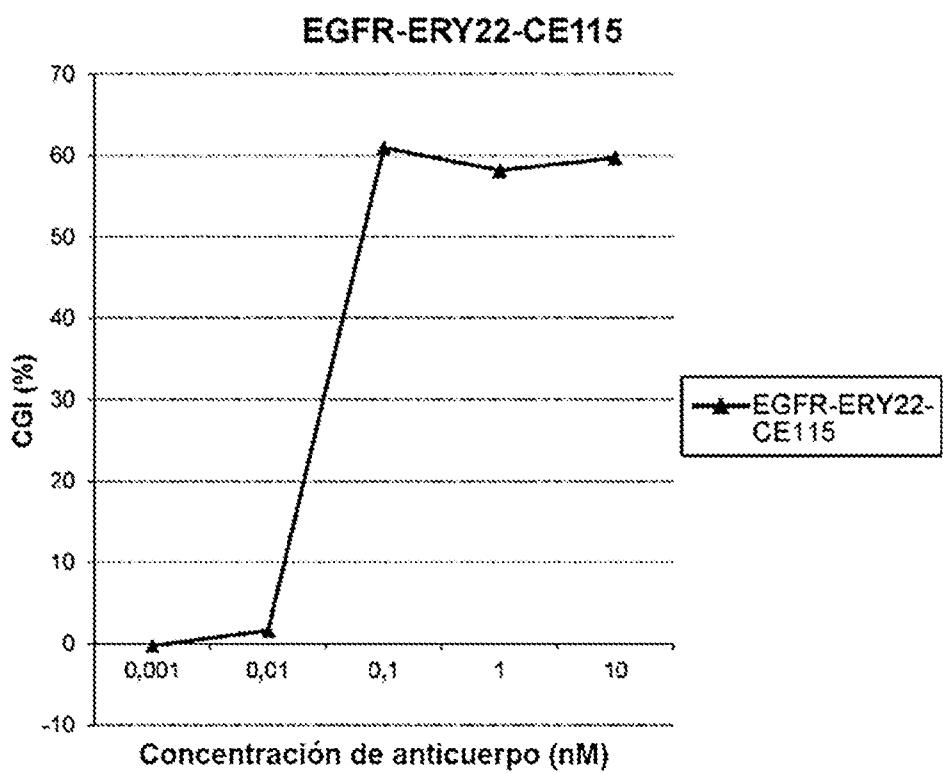


FIG. 9

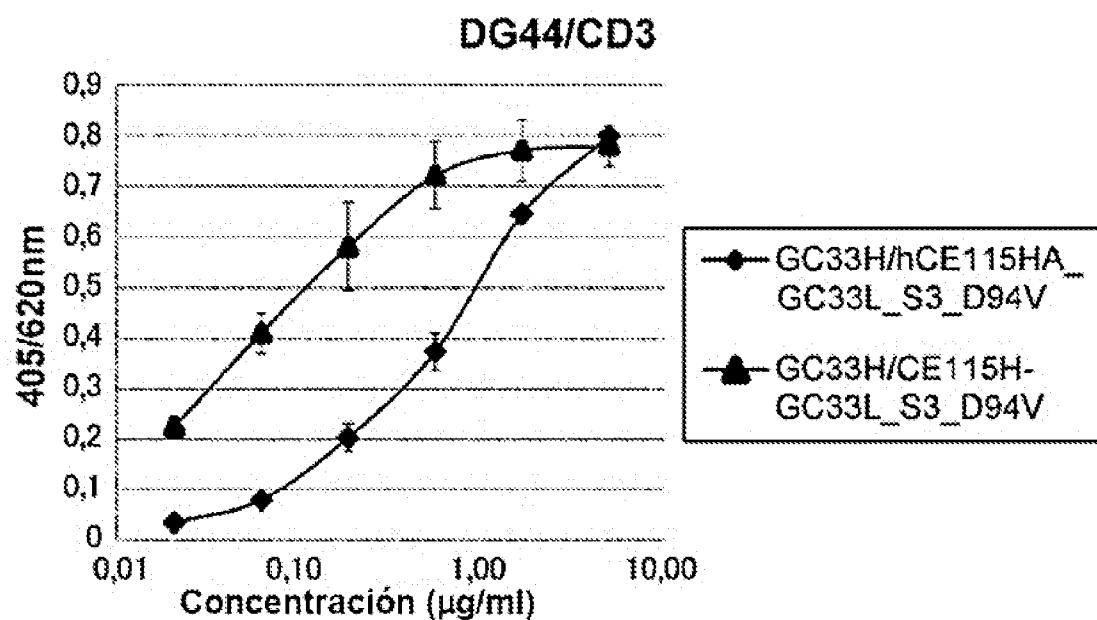


FIG. 10

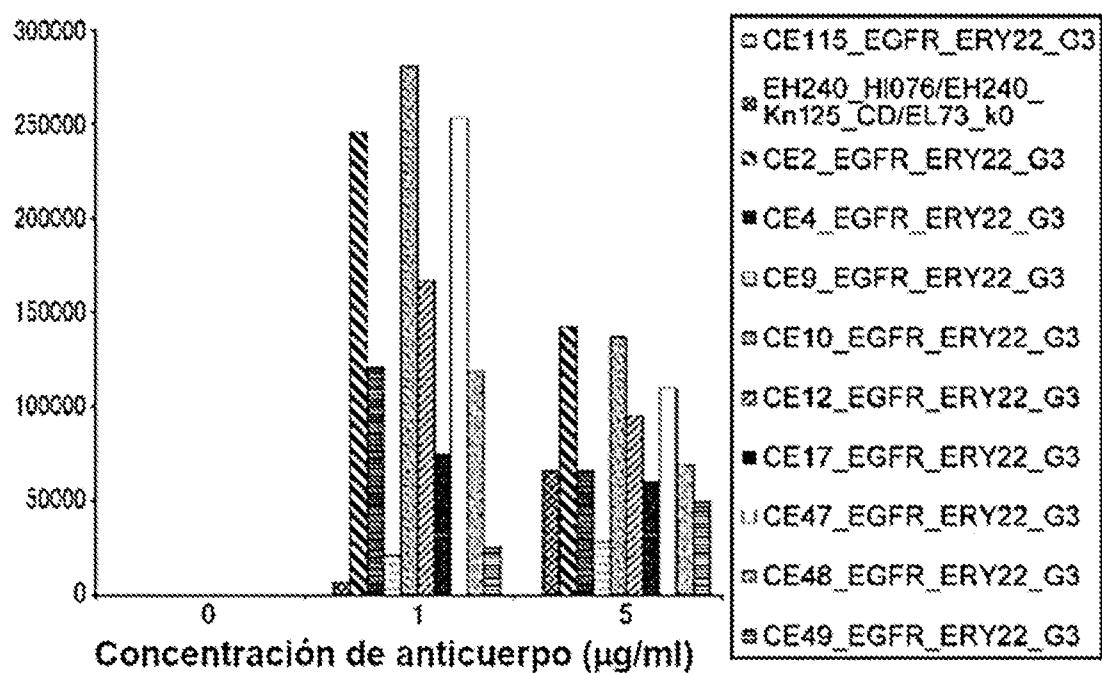


FIG. 11

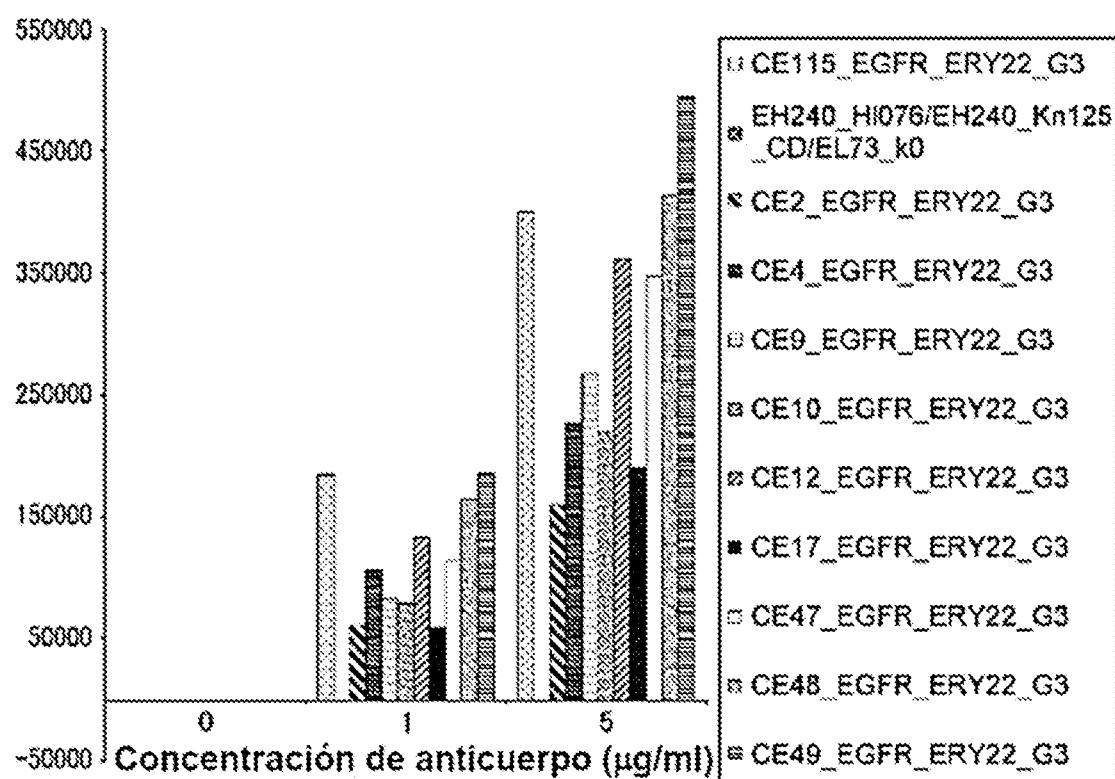


FIG. 12

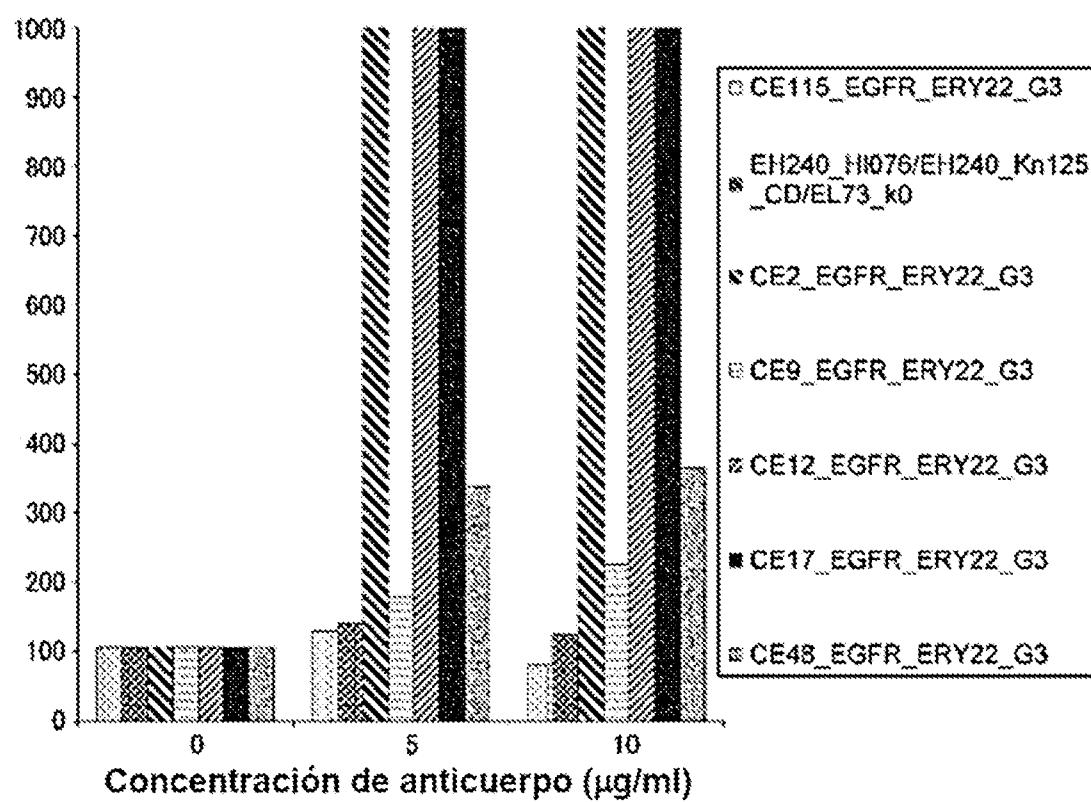


FIG. 13

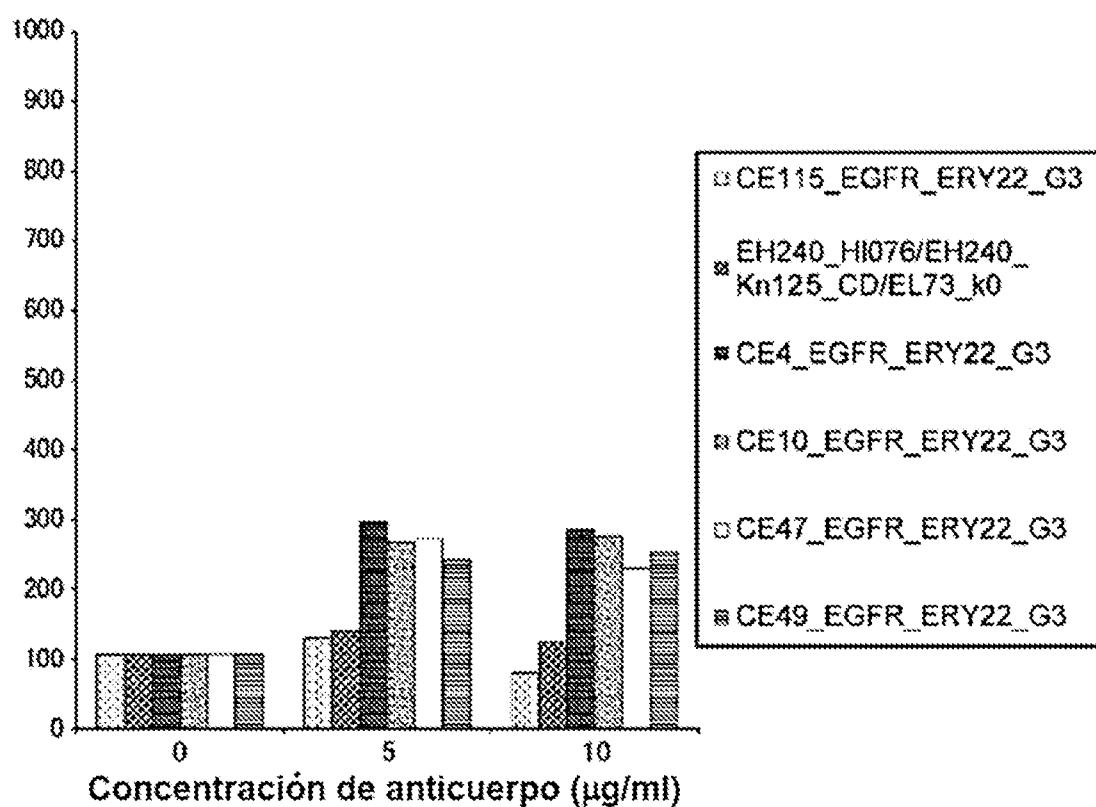


FIG. 14

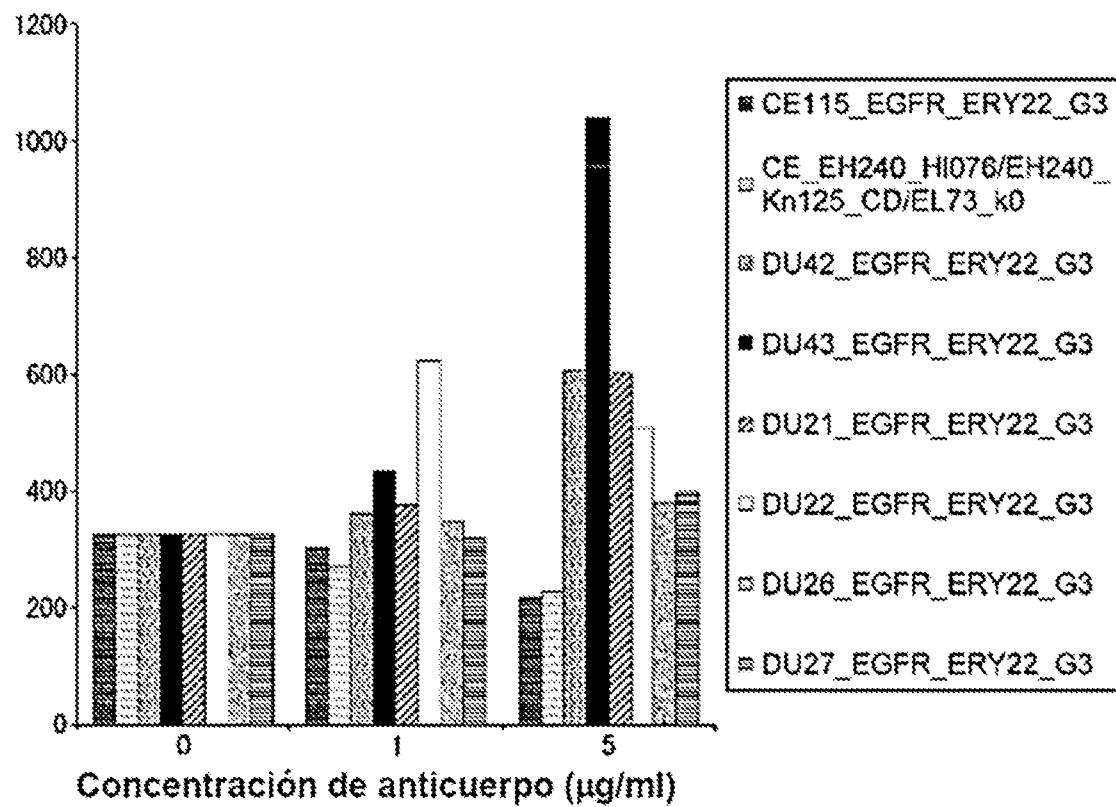


FIG. 15

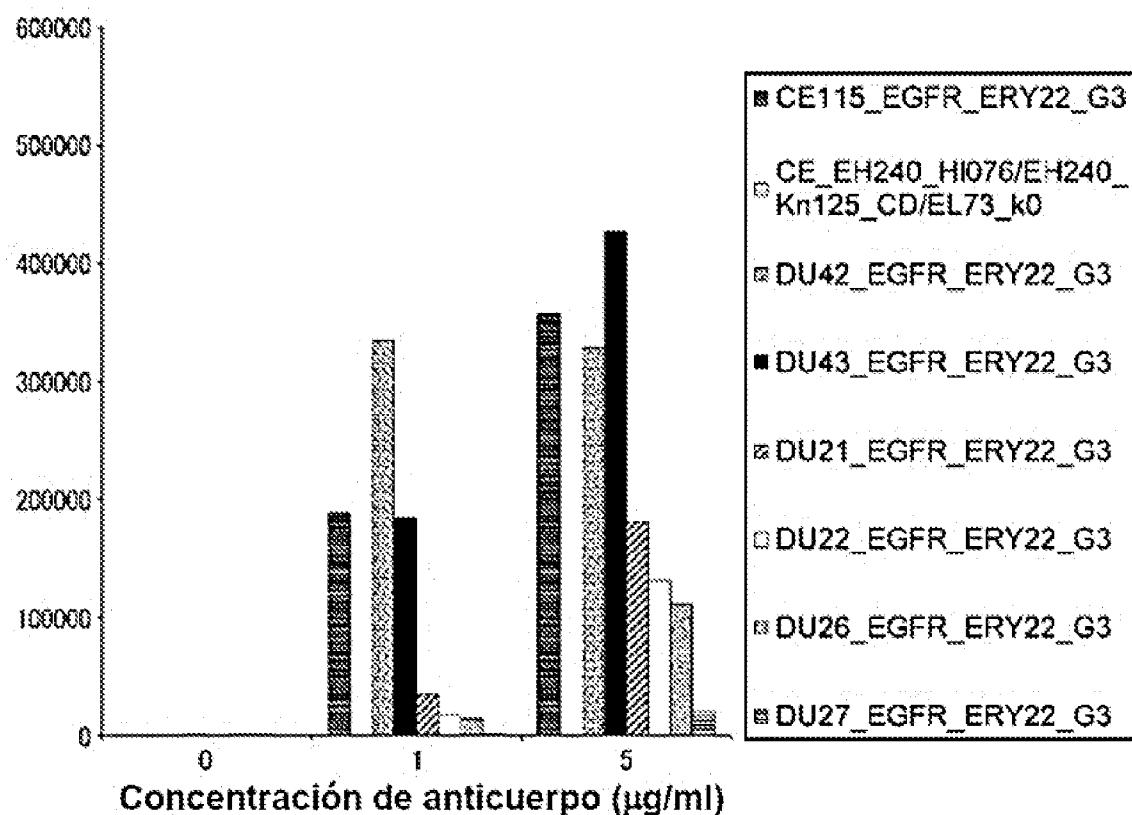


FIG. 16

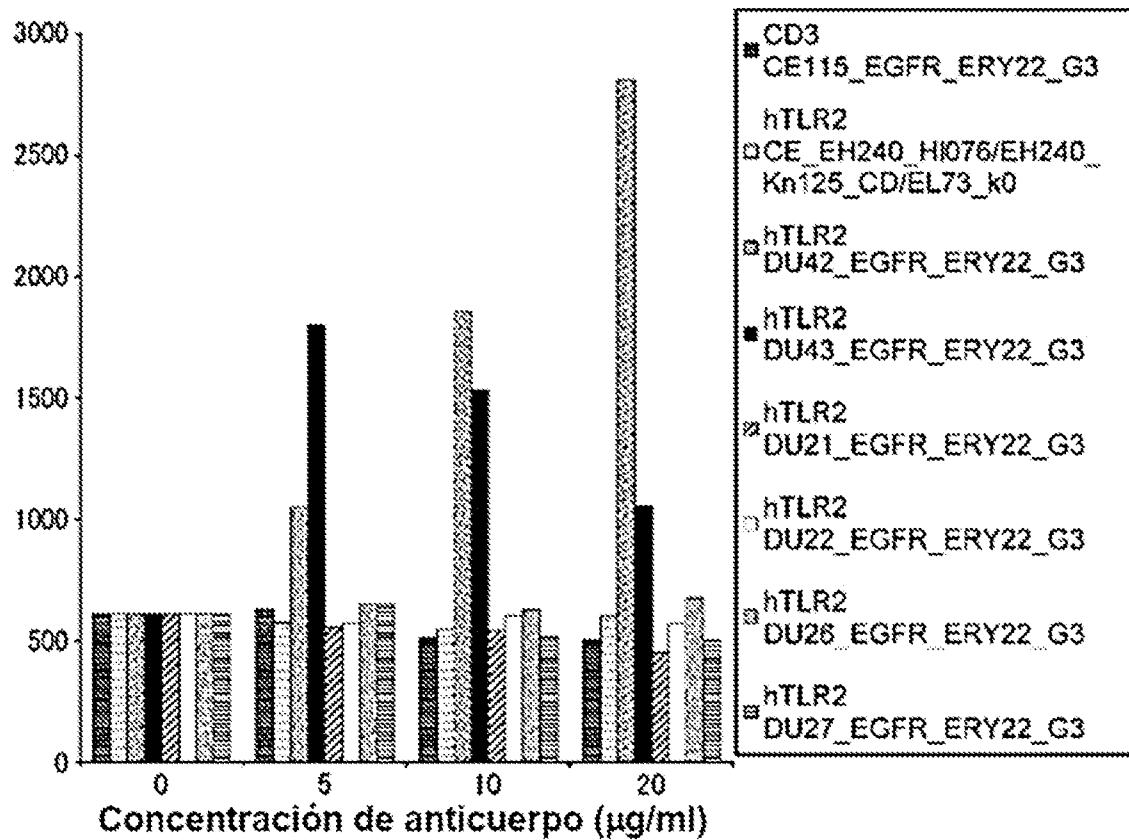


FIG. 17

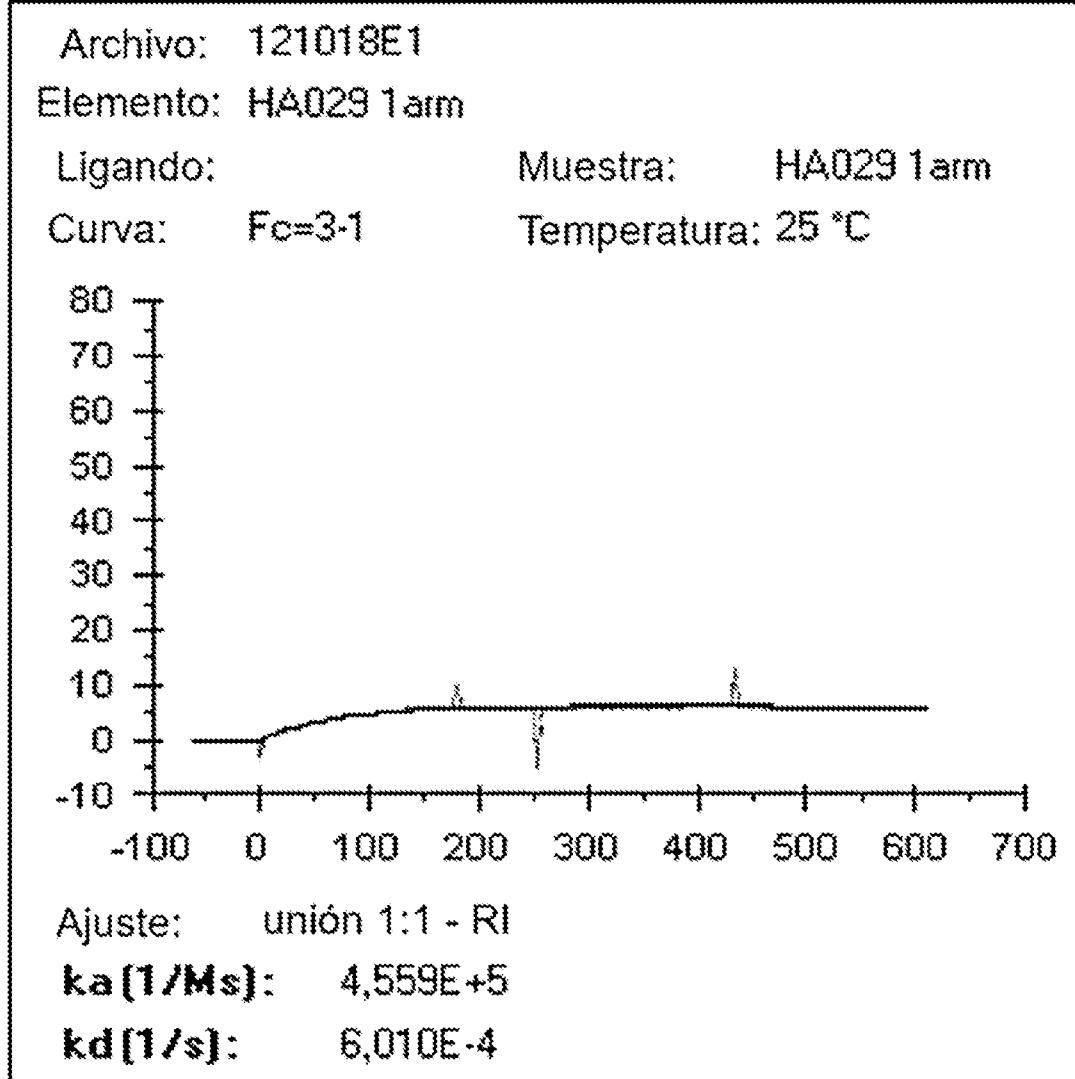


FIG. 18

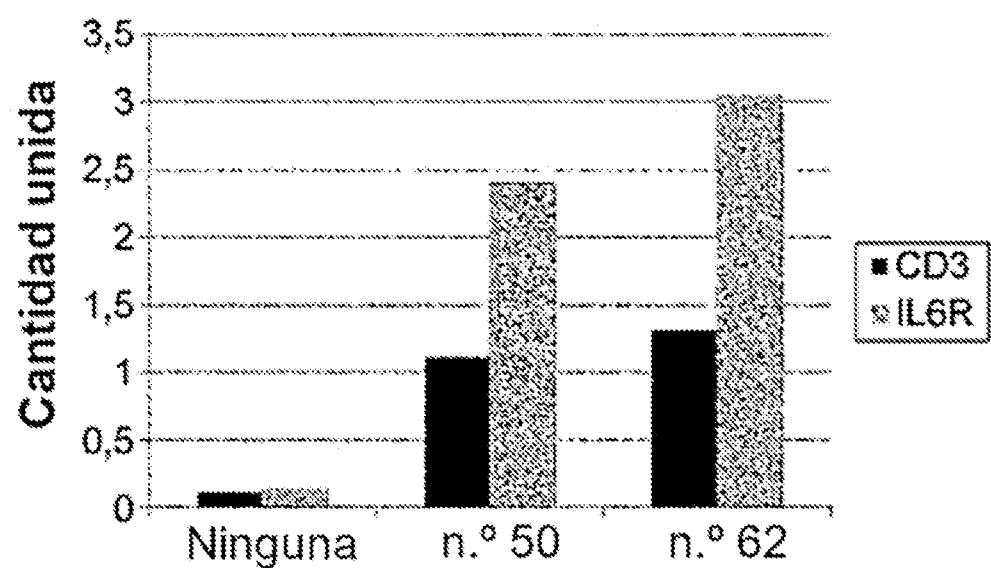


FIG. 19

# ES 2 989 110 T3

niADHE2b-4

N. <sup>o</sup>	Valor de ELISA (absorbanda a 450 nm)			Razón con respecto a NC		N. <sup>o</sup>	Valor de ELISA (absorbanda a 450 nm)			Razón con respecto a NC	
	MgA	CD3	NC	S/N de MgA	S/N de CD3		MgA	CD3	NC	S/N de MgA	S/N de CD3
1	0,069	0,049	0,068	1,1	0,9	49	0,062	0,055	0,061	1,0	0,9
2	0,064	0,053	0,061	1,0	0,9	50	0,106	0,077	0,049	2,2	16,8
3	0,068	0,057	0,058	1,0	1,0	51	0,061	0,059	0,059	1,0	1,0
4	0,066	0,053	0,064	1,0	0,8	52	0,063	0,060	0,060	1,1	1,0
5	0,067	0,061	0,068	1,0	0,9	53	0,063	0,061	0,061	1,0	1,0
6	0,102	0,545	0,056	1,8	9,7	54	0,070	0,063	0,064	1,1	1,0
7	0,110	0,624	0,054	2,0	11,6	55	0,122	0,621	0,049	2,5	16,8
8	0,077	0,075	0,077	1,0	1,0	56	0,126	0,889	0,052	2,4	17,1
9	0,123	0,808	0,052	2,4	15,5	57	0,060	0,050	0,083	1,1	0,9
10	0,051	0,372	0,051	1,0	7,3	58	0,052	0,048	0,050	1,0	1,0
11	0,056	0,058	0,053	1,1	1,0	59	0,068	0,064	0,067	1,0	1,0
12	0,054	0,053	0,052	1,0	1,0	60	0,062	0,070	0,055	1,1	1,3
13	0,056	0,052	0,056	1,0	0,9	61	0,063	0,061	0,061	1,0	1,0
14	0,063	0,059	0,062	1,0	1,0	62	0,065	0,062	0,061	1,1	1,0
15	0,069	0,060	0,062	1,1	1,0	63	0,134	0,632	0,050	2,7	16,6
16	0,066	0,062	0,063	1,0	1,0	64	0,081	0,058	0,056	1,1	1,1
17	0,067	0,067	0,061	1,1	0,9	65	0,075	0,067	0,074	1,0	0,9
18	0,061	0,056	0,057	1,1	1,0	66	0,063	0,057	0,060	1,1	1,0
19	0,067	0,060	0,067	1,0	0,9	67	0,083	0,072	0,050	1,7	13,4
20	0,058	0,026	0,067	1,0	9,2	68	0,064	0,060	0,063	1,0	1,0
21	0,058	0,061	0,054	1,1	0,9	69	0,055	0,050	0,053	1,0	0,9
22	0,064	0,059	0,061	1,0	1,0	70	0,069	0,071	0,070	1,0	1,0
23	0,067	0,063	0,069	1,0	0,9	71	0,053	0,050	0,053	1,0	0,9
24	0,065	0,062	0,062	1,0	1,0	72	0,059	0,056	0,056	1,1	1,0
25	0,068	0,056	0,062	1,1	0,9	73	0,102	0,785	0,051	2,0	15,4
26	0,056	0,061	0,053	1,0	1,0	74	0,060	0,056	0,056	1,0	0,9
27	0,061	0,061	0,060	1,0	1,0	75	0,061	0,057	0,059	1,0	1,0
28	0,065	0,063	0,063	1,0	1,0	76	0,061	0,058	0,058	1,1	1,0
29	0,065	0,061	0,063	1,0	1,0	77	0,063	0,062	0,069	0,9	0,9
30	0,067	0,060	0,062	1,1	1,0	78	0,054	0,073	0,049	1,1	1,5
31	0,066	0,060	0,064	1,0	0,9	79	0,143	0,844	0,054	2,6	15,6
32	0,071	0,070	0,067	1,1	1,0	80	0,068	0,068	0,063	1,1	1,1
33	0,071	0,061	0,063	1,1	1,0	81	0,059	0,056	0,059	1,0	1,0
34	0,063	0,063	0,062	1,0	1,2	82	0,061	0,056	0,050	1,0	0,9
35	0,061	0,049	0,048	1,1	1,0	83	0,064	0,059	0,059	1,1	1,0
36	0,121	0,794	0,049	2,5	16,2	84	0,068	0,060	0,064	1,1	0,9
37	0,050	0,346	0,049	1,0	7,1	85	0,065	0,061	0,064	1,0	1,0
38	0,071	0,061	0,060	1,2	1,0	86	0,058	0,051	0,052	1,1	1,0
39	0,063	0,059	0,061	1,0	1,0	87	0,055	0,052	0,052	1,1	1,0
40	0,069	0,067	0,067	1,0	1,0	88	0,062	0,060	0,058	1,1	1,1
41	0,073	0,067	0,071	1,1	0,9	89	0,067	0,131	0,061	1,1	2,1
42	0,051	0,391	0,046	1,1	8,1	90	0,065	0,060	0,058	1,1	1,0
43	0,121	0,820	0,046	2,5	17,1	91	0,133	0,836	0,049	2,7	16,9
44	0,126	0,816	0,053	2,4	15,4	92	0,080	0,087	0,083	1,0	1,0
45	0,054	0,050	0,052	1,0	1,0	93	0,060	0,054	0,053	1,1	1,0
46	0,067	0,063	0,063	1,1	1,0	94	0,076	0,069	0,068	1,1	1,0
47	0,054	0,051	0,053	1,0	1,0	95	0,068	0,069	0,082	1,1	1,1
48	0,083	0,061	0,092	0,9	0,9	96	0,076	0,069	0,071	1,1	1,0

**FIG. 20**

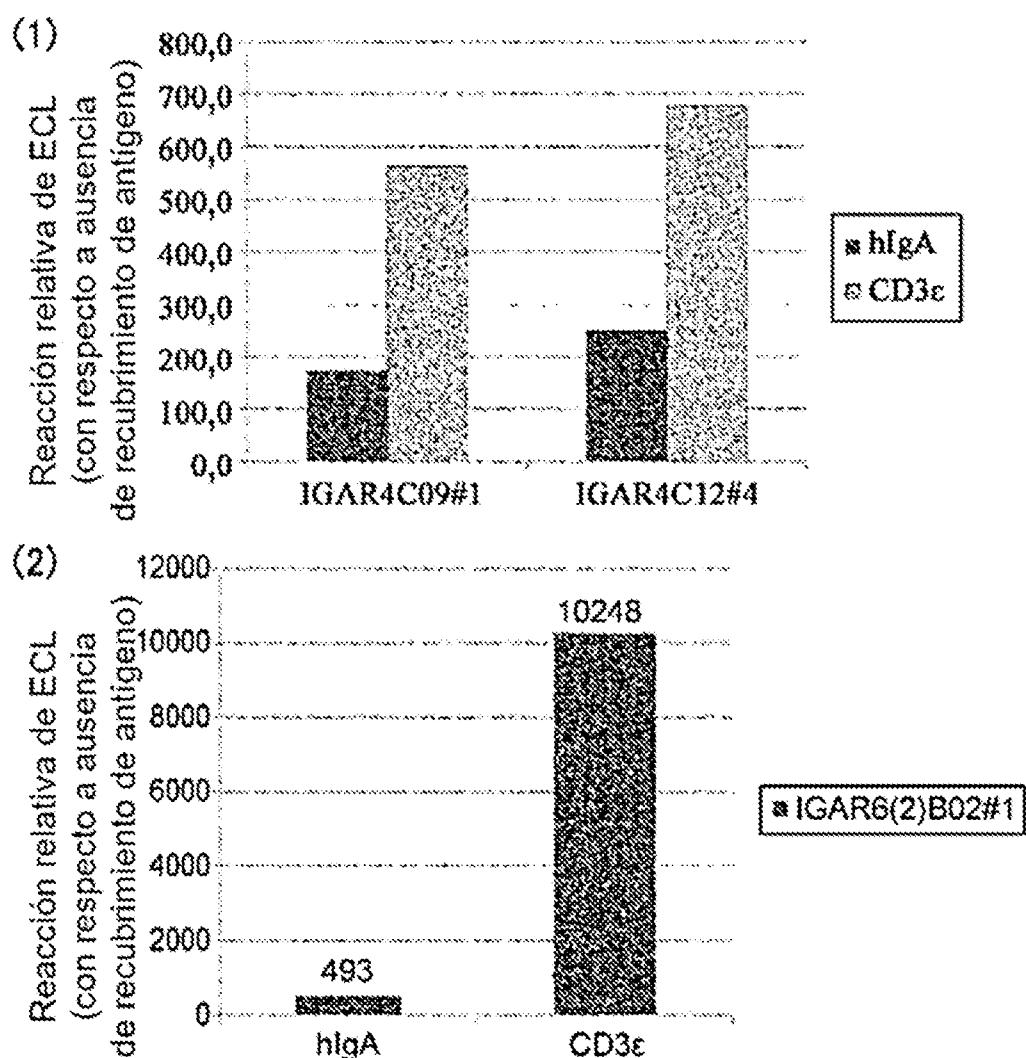


FIG. 21

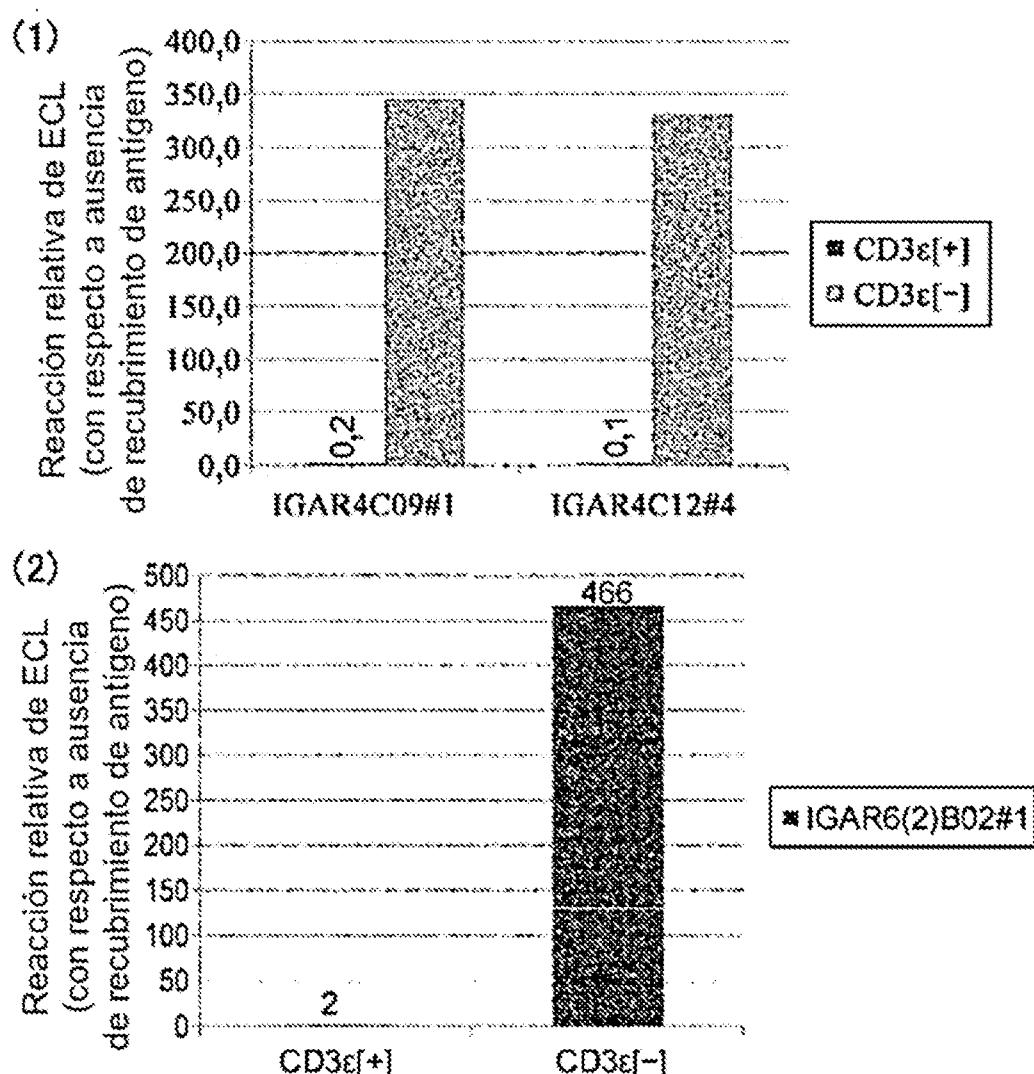


FIG. 22

# ES 2 989 110 T3

1540HB2b-4

N.	Valor de ELISA (absorbancia a 450 nm)			Razón con respecto a NC		Valor de ELISA (absorbancia a 450 nm)			Razón con respecto a NC		
	CD154	CD3	NC	S/N de CD154	S/N de CD3	N.	CD154	CD3	NC	S/N de CD154	S/N de CD3
1	0,077	0,061	0,062	1,2	1,0	49	0,069	0,210	0,066	1,0	3,2
2	0,060	0,114	0,050	1,2	2,3	50	0,110	0,751	0,049	2,2	15,3
3	0,053	0,048	0,050	1,1	1,0	51	0,046	0,044	0,049	0,9	0,9
4	0,048	0,046	0,049	1,0	0,9	52	0,060	0,178	0,052	1,0	3,4
5	0,053	0,050	0,057	0,9	0,9	53	0,050	0,048	0,059	0,8	0,8
6	0,057	0,052	0,054	1,1	1,0	54	0,063	0,057	0,064	1,0	0,9
7	0,088	0,076	0,070	1,1	0,9	55	0,053	0,076	0,054	1,0	18,1
8	0,060	0,059	0,059	1,0	1,0	56	0,058	0,057	0,061	0,9	0,9
9	0,053	0,062	0,060	0,9	1,0	57	0,050	0,052	0,048	1,0	1,1
10	0,048	0,047	0,048	1,0	1,0	58	0,050	0,048	0,048	1,0	0,9
11	0,049	0,062	0,052	0,9	1,2	59	0,062	0,067	0,059	1,1	1,1
12	0,069	0,047	0,047	1,3	1,0	60	0,060	0,067	0,052	1,2	1,3
13	0,068	0,202	0,052	1,1	5,8	61	0,057	0,065	0,058	1,0	1,1
14	0,069	0,110	0,059	1,0	1,9	62	0,109	0,749	0,052	2,1	14,4
15	0,053	0,063	0,058	0,9	0,9	63	0,062	0,068	0,060	0,9	1,0
16	0,061	0,117	0,084	1,0	1,8	64	0,049	0,052	0,051	1,0	1,0
17	0,064	0,058	0,058	1,1	1,0	65	0,065	0,059	0,058	1,1	1,0
18	0,183	0,255	0,083	2,0	8,1	66	0,054	0,055	0,058	0,9	0,9
19	0,054	0,087	0,059	0,9	1,1	67	0,049	0,048	0,048	1,0	0,9
20	0,057	0,179	0,049	1,2	3,7	68	0,065	0,175	0,064	1,0	2,7
21	0,051	0,051	0,053	1,0	1,3	69	0,055	0,052	0,057	1,0	0,9
22	0,060	0,680	0,054	6,9	12,8	70	0,047	0,046	0,048	1,0	1,0
23	0,058	0,094	0,063	0,9	1,5	71	0,059	0,058	0,061	1,0	1,0
24	0,059	0,234	0,061	1,0	3,8	72	0,057	0,050	0,058	1,0	1,5
25	0,066	0,060	0,051	1,1	1,0	73	0,059	0,077	0,057	1,0	1,4
26	0,060	0,057	0,049	1,0	1,2	74	0,062	0,192	0,057	0,9	3,4
27	0,046	0,046	0,048	1,0	1,0	75	0,059	0,130	0,071	0,8	1,8
28	0,054	0,169	0,051	1,1	3,3	76	0,055	0,046	0,048	1,1	1,0
29	0,049	0,182	0,047	1,0	3,9	77	0,049	0,054	0,050	1,0	1,1
30	0,051	0,062	0,050	1,0	1,0	78	0,054	0,052	0,054	1,0	1,0
31	0,045	0,045	0,046	1,0	1,0	79	0,054	0,058	0,054	1,0	1,0
32	0,051	0,050	0,053	1,0	0,9	80	0,125	0,816	0,057	2,2	14,3
33	0,073	0,125	0,074	1,0	1,7	81	0,048	0,046	0,049	1,0	0,9
34	0,052	0,050	0,053	1,0	0,9	82	0,052	0,056	0,051	1,0	1,1
35	0,067	0,121	0,072	0,9	1,7	83	0,053	0,410	0,054	1,0	7,6
36	0,055	0,648	0,053	1,0	12,2	84	0,065	0,057	0,064	1,0	0,9
37	0,061	0,381	0,053	1,0	7,2	85	0,054	0,048	0,053	1,0	0,9
38	0,050	0,047	0,051	1,0	0,9	86	0,053	0,182	0,056	0,9	1,8
39	0,061	0,047	0,051	1,0	0,9	87	0,051	0,050	0,054	0,9	0,9
40	0,072	0,104	0,070	1,0	1,5	88	0,054	0,054	0,053	1,0	1,0
41	0,052	0,051	0,051	1,0	1,0	89	0,065	0,087	0,070	0,9	1,2
42	0,054	0,055	0,058	0,9	0,9	90	0,047	0,072	0,051	0,9	1,4
43	0,052	0,086	0,052	1,0	1,7	91	0,062	0,047	0,052	1,2	0,9
44	0,061	0,050	0,055	1,1	0,9	92	0,052	0,052	0,052	1,0	1,0
45	0,049	0,047	0,048	1,0	1,0	93	0,048	0,047	0,048	1,0	1,0
46	0,043	0,043	0,046	0,9	0,9	94	0,056	0,803	0,058	1,0	13,8
47	0,056	0,217	0,056	1,0	3,7	95	0,059	0,183	0,058	1,0	3,2
48	0,073	0,116	0,073	1,0	1,5	96	0,074	0,069	0,057	1,1	1,0

**FIG. 23**

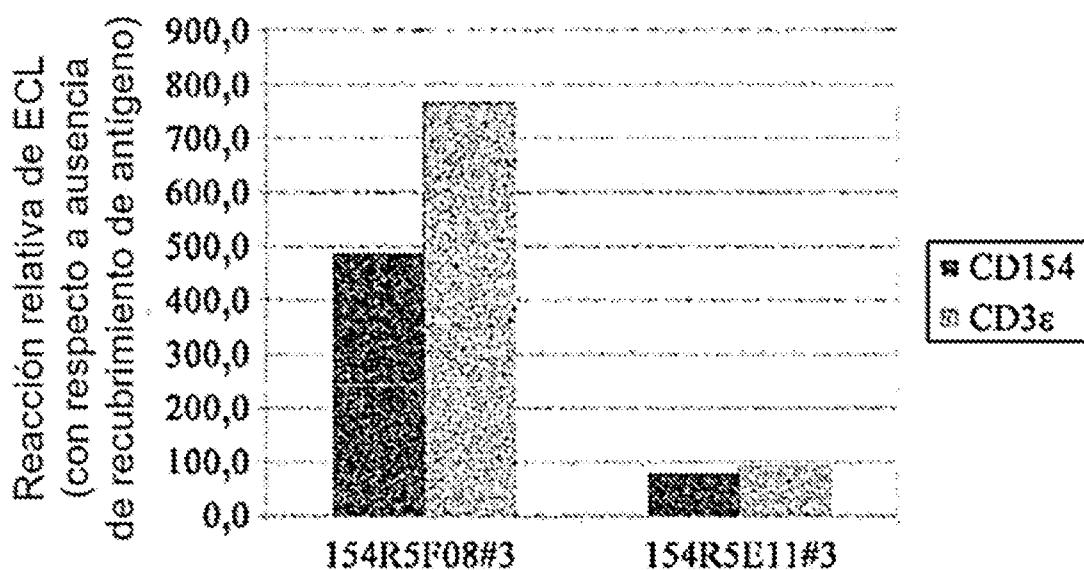


FIG. 24

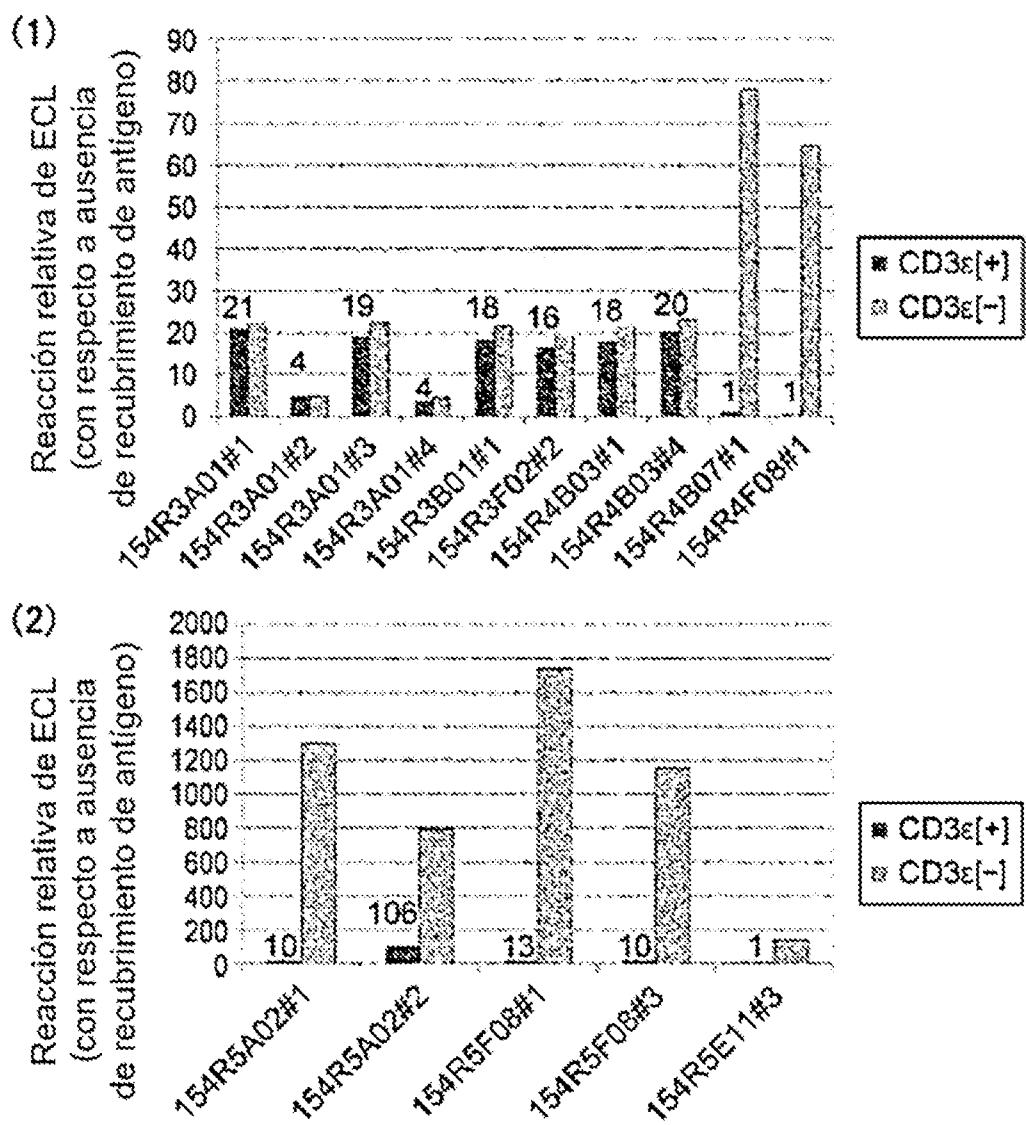


FIG. 25