



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-075370-00004-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 92

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-232125-00000-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE DE INVENCION PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. 15.075.370

54. TITULO: ANTICUERPOS ANTI- $\alpha\beta$ TCR

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: GENZYME CORPORATION

DOMICILIO: 500 Kendall Street, Cambridge,
Massachusetts, 02142, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C.,

30 SET. 2015

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-075370-00004-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 92

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-232125-00000-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSION, DIVISION Y FUSION DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒**GENZYME CORPORATION**

Nombre o Denominación / Nombre social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	500 Kendall Street	Cambridge, Massachusetts, 02142
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del representante o apoderado

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

Apellidos y Nombre

39.779.654 de Bogotá

Documento de Identificación

70.819 de C.S.J.

T.P. No.

Dirección del representante		Ciudad
Calle 94 A No. 7 A - 09		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
info@castellanosyco.co	7 550158	7 560770

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de su radicación o protocolo general _____

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____	Expediente 14.075.370	Expediente _____
De: _____	No. de Divisional UNO (1)	De: _____
A: _____		A: _____

5. Comprobante de Pago No. 15-106917 y 15-106918 Fecha Septiembre 30 de 2015

6. Anexos

- ☒ Comprobantes de pago de las tasas
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☒ Texto de la descripción, reivindicaciones, resumen, figuras y secuencias

7. Firma

<u>MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO</u>	
Nombre y Apellidos	Firma
	<u>39.779.654 de Bogotá</u> <u>70.819 C.S.J.</u>
	C.C. T.P.

30 SET. 2015

COLOMBIA

PODER

El (los) GENZYME CORPORATION

Domiciliados en 500 Kendall Street
Cambridge, Massachusetts, 02142
Estados Unidos

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso -administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de protección de variedades vegetales
- c) Para la obtención de registros sanitarios;
- d) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- d) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy

en

por

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **GENZYME CORPORATION**

Of 500 Kendall Street
Cambridge, Massachusetts, 02142
United States

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and for MARGARITA CASTELLANOS a.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of plant variety protection
- c) For the obtainment of Sanitary registrations;
- d) For the obtainment of copyright registrations
- d) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

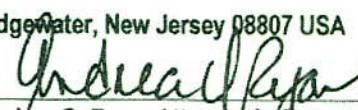
In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this **March 25, 2014**

in **Bridgewater, New Jersey 08807 USA**

by


Andrea Q. Ryan, Attorney-in-Fact

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
castellanos@castellanosyco.co

ANTICUERPO ANTI- $\alpha\beta$ TCR

La presente invención se refiere a un anticuerpo específico para el receptor de linfocitos T alfa beta (abreviadamente en lo sucesivo $\alpha\beta$ TCR por la expresión inglesa *$\alpha\beta$ T cell receptor*). En particular, la invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR humanizado, que se deriva del anticuerpo monoclonal BMA031 de m μ rido, y al uso de dicho anticuerpo humanizado en terapia inmunosupresora.

Introducción

El uso de agentes inmunosupresores en enfermedades autoinmunitarias y terapia de trasplante de órganos está bien documentado; sin embargo, el proceso está lejos de ser óptimo. La toxicidad, las infecciones oportunistas, la tormenta de citoquinas y el aumento del riesgo de cáncer predominan en pacientes tratados con estos agentes. El uso de productos biológicos en este campo ha mejorado hasta cierto punto el resultado de los pacientes, sin embargo estos efectos secundarios permanecen evidentes.

El uso de antiseros policlonales contra los linfocitos es bien conocido para fines de inmunosupresión. Sin embargo, los antiseros tienen una producción laboriosa, muestran propiedades que varían de lote a lote y es limitada la especificidad que se puede obtener utilizando antiseros policlonales.

La producción de anticuerpos monoclonales por tecnología de hibridomas fue descrita por primera vez por Köhler y Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)). En comparación con los antiseros policlonales, los anticuerpos monoclonales (mAb) son más específicos y tienen propiedades más consistentes. Los mAb han sido usados más frecuentemente y con más éxito para terapia inmunosupresora en trasplante clínico de órganos. Sin embargo, la mayoría de los mAb utilizados como agentes inmunosupresores para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y en pacientes con trasplante tienen amplia capacidad inmunosupresora, influyendo por tanto indeseablemente en las funciones de un amplio espectro de células inmunitarias, presumiblemente no todas implicadas en el rechazo de injertos.

Los anticuerpos monoclonales de ratón contra antígenos del receptor de superficie de linfocitos T fueron producidos por primera vez en 1979 utilizando la tecnología de hibridomas (Kung *et. al.*, (1979) *Science* 206:347-349). De los tres anticuerpos monoclonales descubiertos por Kung *et. al.*, un anticuerpo denominado muromonab-CD3 (OKT3) tenía especificidad definida para el receptor CD3 del linfocito T, reaccionando con más del 95% de los linfocitos T maduros periféricos sin afectar a los timocitos inmaduros. La unión del OKT3 al complejo CD3 causa la internalización del receptor CD3 y la pérdida de células positivas a CD3 de la periferia. El tratamiento satisfactorio con OKT3 se asocia

a un descenso rápido de linfocitos T positivos a CD3 desde aproximadamente 60% hasta menos del 5%.

El OKT3 ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de pacientes que sufren rechazo agudo de aloinjertos después de un trasplante de riñón (Russell, P.S., Colvin, R.B., Cosimi, A.B. (1984) *Annu. Rev. Med.* 35:63 y Cosimi, A.B., Burton, R.C., Colvin, R.B. *et al.* (1981) *Transplantation* 32:535). Por otra parte, el OKT3 y un complemento de conejo se utilizaron para purgar linfocitos T maduros a partir de médula ósea de donantes para impedir la enfermedad aguda de injerto frente a hospedante (abreviadamente GVHD por la expresión inglesa *graft versus host disease*) en alotrasplante de médula ósea (Prentice, H.G., Blacklock, H.A., Janossy, G. *et al.*, (1982) *Lancet* 1:700 y Blacklock, H.A., Prentice, H.G., Gilmore, M.J. *et al.*, (1983) *Exp. Hematol.* 11:37). Aunque el tratamiento con OKT3 parece ser eficaz en la prevención de GVHD en el alotrasplante de médula ósea para leucemia aguda, un tratamiento combinado *in vitro/in vivo* con OKT3 no pudo prevenir la GVHD durante la terapia para la inmunodeficiencia grave combinada (Hayward, A.R. *et al.*, (1982) *Clin. Lab. Observ.* 100:665). El tratamiento de linfocitos T con OKT3 provoca diversas respuestas inconsistentes con la inmunosupresión, incluyendo la activación de linfocitos T, la producción de mediadores inmunitarios y la modulación de T3. Se propone que el complejo T3-antígeno reconocido por los CD3-mAb (por ejemplo, OKT3) desempeña un papel crucial durante la activación de los linfocitos T. Los linfocitos T alfa/beta reconocen ligandos péptido-MHC por medio de un conjunto de proteínas multimeras denominado complejo receptor para antígenos de linfocitos T $\alpha\beta$ (TCR)·CD3. Esta estructura está compuesta de un dímero $\alpha\beta$ TCR variable que se une a antígenos y tres dímeros invariantes (CD3 $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$) que están implicados en el transporte superficial, la estabilización y la transducción de señales de TCR·CD3. El receptor de linfocitos T alfa beta ($\alpha\beta$ TCR) se expresa en la mayoría (aproximadamente 95%) de los linfocitos T y tiene un papel crítico en la activación de los linfocitos T a través de la participación del antígeno presentado en el MHC. El restante 5% de células son receptores de linfocitos T gamma delta ($\gamma\delta$ TCR) positivos. La población de células positivas $\gamma\delta$ TCR juega un papel importante en la respuesta inmunitaria innata en la defensa contra infecciones oportunistas de origen bacteriano, viral y fúngico. Las linfocitos T gamma delta no juegan un papel en el rechazo de injertos en trasplantes. Por lo tanto, al hacer actuar como dianas la población de células positivas $\alpha\beta$ TCR y preservar la población positiva de $\gamma\delta$ TCR debe permitir una eficacia terapéutica significativa, mientras se mantiene una protección de referencia inmunitaria contra infecciones oportunistas.

El anticuerpo monoclonal IgG2b de ratón, BMA031, (Borst *et al.*, (Nov. 1990) *Hum. Immunol.* 29(3):175-88; EP0403156) es específico para el determinante común en el complejo TCR alfa/beta/CD3, y no se une al TCR gamma-delta. El BMA031 es altamente inmunosupresor y es capaz de inducir la apoptosis de linfocitos T activados por un

mecanismo de muerte celular inducida por activación (abreviadamente AICD por la expresión inglesa *activation-induced cell death*) (Wesselborg *et al.*, (May 1993) *J. Immunol.* 150(10): 4338-4345). *In vitro* dicho anticuerpo inhibe una reacción de linfocitos mixtos y ha demostrado eficacia clínica preliminar en la prevención de rechazo de injertos en un número de escenarios de trasplante de órganos sólidos, así como el tratamiento de la enfermedad aguda de injerto frente a hospedante (aGVHD) (Kurrle *et al.*, (Feb 1989) *Transplant Proc.* 21(1): 1017-1019). El BMA031 no compromete receptores Fc gamma (FcγR) humanos en la mayoría de la población humana (aproximadamente 10% de los seres humanos poseen FcγR que no se unen al isotipo IgG2b de ratón). Como tal, el anticuerpo no provoca la activación de linfocitos T por reticulación del receptor de linfocitos T y, por tanto, no induce la activación de linfocitos T o la liberación de citoquinas asociadas. En este sentido su perfil es altamente preferible sobre el del OKT3. Sin embargo, el BMA031 es un anticuerpo de murinos y, como tal, no es adecuado para la dosificación repetida en sujetos humanos en vista de la respuesta provocada por el anticuerpo anti-ratón humano (abreviadamente HAMA por la expresión inglesa *human anti-mouse antibody*).

Se han descrito varias versiones humanizadas del BMA031 (véase, EP 0403156; también Shearman *et al.*, (1991) *J. Immunol.* 147:4366-4373). Como se indica en el documento EP0403156, el simple injerto de una región determinante de la complementaridad (abreviadamente CDR por la expresión inglesa *complementarity determining region*) no retuvo satisfactoriamente la unión del antígeno. Un clon con modificaciones de estructura significativas, EUCIV3, se unió satisfactoriamente a linfocitos T; sin embargo, como se ha descrito en el documento EP0403156, la unión al αβTCR no es tan eficaz como el anticuerpo progenitor BMA031, como se determinó por ensayos competitivos de citometría de flujo. Los inventores han demostrado también que la capacidad de EuCIV3 de inhibir una respuesta inmunitaria *in vitro* es significativamente reducida comparada con la del BMA031 (véase, Fig. 2). Adicionalmente, EuCIV3 fue originalmente generado en una cadena principal de IgG1 o IgG4 humana de tipo natural que todavía retenía la unión de FcγR. Estos anticuerpos humanizados por lo tanto permitieron la activación, la proliferación de linfocitos T y la liberación concomitante de citoquinas y como tales tenían propiedades significativamente diferentes de las propiedades originales del BMA031.

La modificación de la glicosilación de anticuerpos es conocida en la técnica. Por ejemplo, se sabe que los anticuerpos aglicosilados pueden tener funcionalidad extensamente modificada; véase, Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318. Sin embargo, formas aglicosiladas de BMA031 humanizado, o derivados con patrones de glicosilación modificados, no han sido descritos previamente.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR humanizado que mejora las propiedades de unión de EuCIV3 y ventajosamente retiene las propiedades inmunosupresoras y no activadoras de los linfocitos T del BMA031.

5 Sumario de la invención

En un primer aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende las CDR del BMA031, y retiene la afinidad de unión del BMA031 para su antígeno correspondiente. En una primera realización, dicho anticuerpo humanizado comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR representadas en SEQ ID NO 7, 12 o 13 y la estructura de IGH3-23 humano representado en SEQ ID NO: 17, donde la posición 6 en la estructura es un residuo donador; en una realización alternativa, la posición 18 en la estructura es un residuo donador. Opcionalmente, las posiciones 49 y/o 69 en la estructura son residuos donadores.

En una segunda realización, el anticuerpo monoclonal humanizado comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR representadas en SEQ ID NO: 15 o 16 y la estructura humana IGHV1-3*01 representada en SEQ ID NO: 18, donde una o más de las posiciones 38, 44 y/o 48 en la estructura es un residuo donador; en una realización alternativa, las posiciones 44 y 48 en la estructura son residuos donadores.

En una tercera realización, el anticuerpo monoclonal humanizado comprende una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR representadas en SEQ ID NO: 14 y la estructura humana IGKV3-11*01 representada en SEQ ID NO: 19, donde las posiciones 70 y/o 71 de la estructura son residuos donadores. Opcionalmente, la posición 46 es un residuo donador.

Ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la primera realización incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada seleccionada de las cadenas pesadas que comprenden las secuencias representadas en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y en una secuencia de la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 14.

Ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la segunda realización incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada seleccionada de las cadenas pesadas que comprenden las secuencias representadas en SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 14. Los anticuerpos humanizados de acuerdo con las realizaciones descritas son versiones humanizadas del BMA031. Sus estructuras primarias difieren de las del anticuerpo humanizado EuCIV3, que ha disminuido la unión al $\alpha\beta$ TCR en comparación con la unión al BMA031.

En el listado de secuencias, las CDR se indican por medio de anotación o subrayado. Las estructuras son todas secuencias fuera de las CDR, que se definen de acuerdo con el

sistema de numeración "Kabat" y extendidas, cuando sea aplicable, por el uso de la definición de "IMGT" CDR. Si no se indica que un residuo estructural ha de ser cambiado para aparearse a una secuencia donadora, ordinariamente se entenderá que es un residuo aceptor.

- 5 Los anticuerpos humanizados pueden comprender una región constante. En una realización, la región constante es de origen humano.

Los anticuerpos humanizados de la invención pueden además ser modificados por ingeniería de Fc. Las inmunoglobulinas son susceptibles de reticularse con los receptores de Fc γ , que puede conducir a la activación de los linfocitos T constitutivos para anticuerpos anti-linfocitos T. Con el fin de evitar la reticulación de Fc γ , los anticuerpos
10 pueden ser modificados para eliminar la región Fc, tal como por la generación de fragmentos Fab o Fv; sin embargo, las inmunoglobulinas truncadas carecen de funciones efectoras beneficiosas y exhiben una menor semivida en suero. Por lo tanto, la región Fc del anticuerpo humanizado puede ser modificada para prevenir una reticulación de Fc γ .

- 15 Las técnicas ilustrativas incluyen la generación de inmunoglobulinas aglicosiladas, por ejemplo por modificación de la región Fc por una mutación N297Q. Las inmunoglobulinas que no pueden unirse a Fc γ están descritas también por Armour *et al.*, (1999) *Eur. J. Immunol* 29:2613-2624. La modificación efectuada al IgG1 es conocida como la modificación Δ ab, y consiste en una combinación de la mutación Δ a, en la cual los
20 residuos de IgG están sustituidos en las posiciones 327, 330 y 331, y los residuos de IgG2 están sustituidos en las posiciones 233-236, y la mutación Δ b, en la cual el residuo 236 está suprimido. En otra realización se puede modificar el patrón de glicosilación de anticuerpos de acuerdo con la invención.

- En una realización, el anticuerpo comprende una o más de las mutaciones S298N, T299A
25 e Y300S.

En otras realizaciones, el anticuerpo comprende dos o más de las mutaciones N297Q, S298N, T299A e Y300S. Por ejemplo, se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende las mutaciones múltiples N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S o S298N/Y300S.

- 30 En un segundo aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende las CDR del BMA031, y retiene las propiedades de supresión de linfocitos T del BMA031. Dicho anticuerpo humanizado comprende preferentemente una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16 y una región variable de la cadena ligera que comprende la
35 secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 14.

En un tercer aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica al menos una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con los aspectos precedentes de las realizaciones descritas. El ácido nucleico puede codificar

regiones variables y constantes del anticuerpo humanizado. Cadenas pesadas y ligeras pueden estar codificadas en ácidos nucleicos separados o en la misma molécula de ácido nucleico.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona una célula que expresa un ácido nucleico de acuerdo con el aspecto precedente. La célula es, por ejemplo, una célula adaptada para expresar moléculas de anticuerpo en cultivo. El ácido nucleico puede incluir secuencias de señal y/u otras secuencias o modificaciones que son requeridas para, o que modulan, la expresión de la molécula de anticuerpo en la célula, y/o la secreción de la molécula de anticuerpo desde la célula.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo humanizado como se describe en los aspectos anteriores, para su uso en la supresión de la respuesta mediada por linfocitos T en un sujeto.

Por ejemplo, la respuesta mediada por linfocitos T puede estar implicada en un estado seleccionado de trasplante de tejido, incluyendo trasplante de órganos sólidos y trasplante de tejidos compuestos, injerto de tejido, esclerosis múltiple y diabetes de tipo 1.

Adicionalmente, otra realización proporciona un método para tratar un sujeto que padece un estado que implica una respuesta mediada por linfocitos T anómalos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis farmacéutica eficaz de un anticuerpo de acuerdo con las realizaciones descritas.

Por tanto se han generado anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR no activadores humanizados que no inducen la liberación de citoquinas que son capaces de modulación selectiva del $\alpha\beta$ TCR y de inducir apoptosis de linfocitos T positivos $\alpha\beta$ TCR activados. Estos anticuerpos han sido generados para uso como agentes inmunosupresores en enfermedades mediadas por linfocitos T. Estos anticuerpos han sido generados a través de la humanización de un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR de ratón BMA031 y por la modificación por ingeniería de Fc de los anticuerpos humanizados para prevenir la implicación de receptores Fc gamma. Los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas retienen la afinidad de unión del BMA031, a diferencia de las versiones humanizadas de BMA031 disponibles en la técnica. Adicionalmente, como se muestra en ensayos de aprendizaje *in vitro*, las propiedades inmunosupresoras de los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas son superiores a las del BMA031. Por otra parte, a diferencia de los anticuerpos BMA031 humanizados de la técnica anterior, los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas no inducen la liberación de citoquinas en PBMC normal.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un anticuerpo que comprende un Fc modificado, en el cual dicho Fc modificado comprende un patrón de glicosilación modificado que reduce la unión del receptor Fc γ R, que comprende una o más de las mutaciones S298N, T299A e Y300S.

En una realización, el anticuerpo comprende dos o más de las mutaciones N297Q,

S298N, T299A e Y300S.

En realizaciones, el anticuerpo comprende las mutaciones múltiples N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S o S298N/Y300S.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo como se describe en los aspectos
5 precedentes de la invención.

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos una cadena pesada de un primer dominio de unión como se describe en los aspectos precedentes de la invención, y un segundo dominio de unión específico para un antígeno específico de tumor.

10 En una realización, el primer dominio de unión comprende una cadena pesada de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

El anticuerpo multiespecífico puede comprender muchas conformaciones diferentes; en una realización, comprende un scFv de anti-TCR/CD3 y un scFv anti-tumoral.

En una realización, el anticuerpo multiespecífico es biespecífico.

15 **Breve Descripción de las Figuras**

Fig. 1. El BMA031 se une más fuertemente al $\alpha\beta$ TCR en comparación con EuCIV3.

La competencia de unión del anticuerpo BMA031 marcado con PE por los anticuerpos BMA031 MolgG2b, BMA031 HulG1 y EuCIV3 HulG1. El EuCIV3 tiene una potencia menor en comparación con el BMA031.

20 **Fig. 2. El EuCIV3 es menos potente que el BMA031 en un ensayo de aprendizaje *in vitro* (abreviadamente IVE por la expresión inglesa *in vitro education*).**

Gráfico que muestra la pérdida de actuación del anticuerpo humanizado EuCIV3 en un estudio biológico cuando se compara con el anticuerpo precursor BMA031. Los linfocitos T CD8⁺ fueron tratados con anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR a varias concentraciones (eje x) y co-
25 cultivados con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido de CMV 495-503 (pp65) durante siete días.

Fig. 3. El HEBE1 se une al $\alpha\beta$ TCR comparablemente con BMA031 en un ensayo de competencia.

La competencia de unión del anticuerpo BMA031 marcado con PE por los anticuerpos
30 BMA031 HulG1, HEBE1 HulG1 y EuCIV3 HulG1. El EuCIV3 tiene una potencia menor en comparación con el BMA031 y el HEBE1.

Fig. 4. El HEBE1 tiene potencia similar al EuCIV3 en un ensayo de aprendizaje *in vitro* (IVE).

El ensayo IVE fue realizado como se describe con relación a la Fig. 2.

35 **Fig. 5. Esquema que muestra rondas iterativas de mutagénesis de dominios variables de anti- $\alpha\beta$ TCR.**

La estructura en la casilla sombreada representa la región FR donde se encuentran ciertos residuos de ratón. Los residuos sombreados en la primera fila de las mutaciones

son los aminoácidos de ratón que son útiles para mantener la velocidad de disociación. Los residuos sombreados en la segunda fila de las mutaciones son los residuos de ratón que rodean las regiones CDR que fueron retenidas durante el proceso final de germinación.

5 **Fig. 6. El anticuerpo humanizado y optimizado tiene una mejor velocidad de disociación en comparación con la de BMA031.**

La cinética de la disociación del anticuerpo del $\alpha\beta$ TCR en linfocitos T fue medida por citometría de flujo. El BMA031 tuvo una mejor velocidad de disociación en comparación el EuCIV3 y el HEBE1. Optimizando el dominio de unión del HEBE1 los inventores fueron
10 capaces de mejorar la velocidad de disociación del HEBE1.H10 en comparación con el BMA031.

Fig. 7. El anticuerpo humanizado optimizado tiene una mejor velocidad de disociación en comparación con el BMA031.

La cinética de disociación de anticuerpo del $\alpha\beta$ TCR en linfocitos T fue medida por
15 citometría de flujo. Optimizando el dominio de unión del HEBE1 los inventores fueron capaces de mejorar la constante de disociación del HEBE1.H66 en comparación con el BMA031.

Fig. 8. El anticuerpo humanizado y optimizado tiene una mejor velocidad disociación en comparación con el BMA031 tanto en formatos Δab como aglicosilados.
20

La cinética de disociación de anticuerpo del $\alpha\beta$ TCR en linfocitos T fue medida por citometría de flujo.

Fig. 9. La optimización del HEBE1 conduce a una funcionalidad equivalente a la del BMA031.

25 El ensayo IVE es como se describe en la Fig. 4. El BMA031 inhibe el aprendizaje de los linfocitos T CD8+, puesto que fueron incapaces de lisar dianas específicas de forma dependiente de la dosis. El anticuerpo humanizado precursor, HEBE1, no fue tan potente como el BMA031 y fue capaz de inhibir solamente el aprendizaje a la dosis más alta (similares resultados se observaron con un segundo Ab humanizado no mejorado, HEBE1
30 H13). Se obtuvieron otras mejoras en el anticuerpo humanizado, HEBE1 H10, que tuvo una potencia equivalente al BMA031 en este ensayo.

Fig. 10. Datos de IVE con anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR.

Ambas series de anticuerpos HEBE1 y GL1 BM mostraron mejoras en los resultados del IVE en comparación con el BMA031.
35

Fig. 11. Células positivas al antígeno en el ensayo IVE según se determina por la unión del tetrámero específica del antígeno.

Las células que son positivas al antígeno (es decir, las que han sido sometidas a aprendizaje en el ensayo IVE) son capaces de unirse a una molécula MHC-tetrámero.

Cuando el ensayo IVE se realizó en presencia de un anticuerpo que ha sido capaz de impedir el aprendizaje de los linfocitos T para el antígeno, hubo menos células capaces de unirse al MHC-tetrámero al final del ensayo.

5 **Fig. 12. Proliferación de células mononucleadas de sangre periférica (abreviadamente PBMC por la expresión inglesa *peripheral blood mononucleated cells*) en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR, OKT3 y perlas estimuladoras.**

La actividad estimuladora de OKT3 no se observó en anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR en esta comparación.

10 **Fig. 13. Liberación de citoquinas de PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR.**
El perfil de liberación de citoquinas de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por el BMA031.

Fig. 14. Liberación de IFN-gamma de linfocitos T en el ensayo IVE.

Se trataron linfocitos T CD8+ con anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR en varias concentraciones (véase la Fig. 2, eje x) y se co-cultivaron con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido de CMV 495-503 (pp65) durante siete días en un ensayo de aprendizaje *in vitro* (IVE). En este ensayo se midió la liberación de IFN-gamma.

Fig. 15. Apoptosis inducida por activación mediante anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR.

Los linfocitos T CD8+ estimulados por antígeno fueron inducidos a la apoptosis por la unión de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR BMA031 y HEBE1 H66. La capacidad del HEBE1 H66 para inducir apoptosis se incrementó en comparación con el BMA031.

Fig. 16. Aislamiento de mutantes de glicosilación y anticuerpos aglicosilados

Gel teñido con azul Coomassie que muestra la expresión y purificación de mutantes de glicosilación.

25 **Fig. 17. Unión de mutantes del anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR a Fc γ RIIIa humano utilizando Biacore**

Se utilizó Biacore para evaluar la unión a Fc γ RIIIa recombinante humano (V158 & F158).

Fig. 18. Unión de mutantes del anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR a Fc γ RI humano utilizando Biacore

30 Se utilizó Biacore para evaluar la unión a humano recombinante y Fc γ RI.

Fig. 19. Liberación de citoquinas desde PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes por glicosilación (día 2)

El perfil de liberación de citoquinas para TNFa, GM-CSF, IFN γ e IL10 de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por el BMA031 y H66 delta AB.

35 **Fig. 20. Liberación de citoquinas desde PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes por glicosilación (día 2)**

El perfil de liberación de citoquinas para IL6, IL4 e IL2 de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por el BMA031 y H66 delta AB.

Fig. 21. Liberación de citoquinas desde PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes por glicosilación (día 4)

El perfil de liberación de citoquinas para TNFa, GM-CSF, IFN γ e IL10 de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por el BMA031 y H66 delta AB.

Fig. 22. Liberación de citoquinas desde PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR mutantes por glicosilación (día 4)

El perfil de liberación de citoquinas para IL6, IL4 e IL2 de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por el BMA031 y H66 delta AB.

Fig. 23. Perfiles de unión de TRACERS.

Los perfiles de unión de anticuerpos bi-específicos tanto a células diana de tumores como linfocitos T humanos evaluados por citometría de flujo.

Fig. 24. Actividad citotóxica de diferentes brazos de reclutamiento de linfocitos T.

Se creó un panel de anticuerpos BMA031 humanizados y de este panel se seleccionó un número de anticuerpos que mostraba actividad citotóxica contra líneas celulares que expresan antígenos tumorales.

Fig. 25. Perfil de liberación de citoquinas de diferentes brazos de reclutamiento de linfocitos T.

Un panel de TRACERS con diferentes brazos de reclutamiento de linfocitos T muestra perfiles similares de liberación de citoquinas. Se detectaron grandes cantidades de citoquinas siguiendo la activación de linfocitos T en presencia de células diana mientras que se observó que en presencia de solamente PBMC humanas no estimuladas los niveles de citoquina eran significativamente más bajos.

Fig. 26. Unión de mutantes del anticuerpo anti-CD52 a Fc γ RIIIa humano usando Biacore

Se utilizó Biacore para evaluar la unión del anti-CD52 modificado al Fc γ RIIIa (V158) humano. Se usó el anti-CD52 que comprende las mutaciones S298N/Y300S en el dominio Fc para evaluar la función efectora de la molécula modificada. A: unión al péptido CD52. B: unión a Fc γ RIIIa (V158). C: unión de control a FcRn de ratón.

Descripción detallada de la Invención.

A menos que se establezca lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados comúnmente comprendidos por un experto en la técnica a la que pertenece ésta invención. Cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden ser utilizados en los métodos o técnicas de la presente invención. Todas las publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad con el fin de describir y revelar las metodologías, reactivos y herramientas descritos en las publicaciones que puedan ser utilizados en relación con la invención.

Los métodos y técnicas de la presente solicitud se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas a través de la presente memoria a menos que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Gennaro, A.R., ed. (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Co.; Hardman, J.G., Limbird, L.E. and Gilman, A.G., eds. (2001) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. et al., eds., *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc.; Weir, D.M. and Blackwell, C.C., eds. (1986) *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T. et al., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al., eds. (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th edition, John Wiley & Sons; Ream et al., eds. (1998) *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, Academic Press; Newton, C.R. and Graham, A., eds. (1997) *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed., Springer-Verlag.

Un anticuerpo monoclonal humanizado, como al que se refiere la presente memoria, es un anticuerpo que está compuesto de una estructura de anticuerpo humano, en el cual se han injertado regiones determinantes de la complementaridad (CDR) de un anticuerpo no humano. También se pueden hacer cambios en la estructura aceptora humana. Los procedimientos para el diseño y producción de anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica y han sido descritos, por ejemplo, en Cabilly et al., Patente de EE.UU. No. 4.816.567; Cabilly et al., solicitud de patente europea 0125023; Boss et al., Patente de EE.UU. No. 4.816.397; Boss et al., solicitud de patente europea 0120694; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., solicitud de patente europea 0194276 B1; Winter, Patente de EE.UU. No. 5.225.539; Winter, solicitud de patente europea 0239400; Padlan, E.A. et al., solicitud de patente europea 0519596. Detalles adicionales sobre anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos modificados por ingeniería y métodos para su preparación se pueden encontrar en Kontermann, R. and Dübel, S. eds. (2001, 2010) *Antibody Engineering*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY.

El término "anticuerpo", a menos que se indique lo contrario, es utilizado para referirse a anticuerpos completos así como a fragmentos de unión a antígenos de dichos anticuerpos. Por ejemplo, el término abarca moléculas IgG de cuatro cadenas, así como fragmentos de anticuerpos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "fragmentos de anticuerpo" se refiere a porciones de un anticuerpo de longitud completa intacto, por ejemplo, como se describe más adelante.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, tales como IgG, IgA o IgM; y de cualquier

subclase, tal como IgG1 o IgG4. Diferentes clases y subclases de inmunoglobulina tienen diferentes propiedades, lo cual puede ser ventajoso en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, los anticuerpos IgG4 tienen unión reducida a receptores de Fc.

5 Especificidad, en el contexto de los anticuerpos descritos en la presente memoria, significa que el anticuerpo reivindicado es capaz de vincular selectivamente su antígeno correspondiente definido, que es el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Los anticuerpos de la invención se unen al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3 expresado en células.

El complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano es el complejo receptor de linfocitos T presentado en la superficie de linfocitos T. Véase, Kuhns *et al.*, (2006) *Immunity* 24:133–139. Este
10 complejo es la diana del anticuerpo monoclonal de murinos BMA031 (véase, la solicitud de patente europea EP 0403156; las SEQ ID No: 1 y 2).

Las inmunoglobulinas de origen natural tienen una estructura de núcleo común en la cual dos cadenas ligeras idénticas (aproximadamente 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas (aproximadamente 55 o 70 kD) forman un tetrámero. La porción amino-terminal de cada
15 cadena se conoce como la región variable (V) y se puede distinguir de las regiones constantes (C) más conservadas del resto de cada cadena. Dentro de la región variable de la cadena ligera (también llamado el dominio V_L) está una porción terminal C conocida como la región J. Dentro de la región variable de la cadena pesada (también llamado el dominio V_H), existe una región D además de la región J. La mayoría de las variaciones de
20 las secuencias de aminoácidos en las inmunoglobulinas está confinada en tres localizaciones separadas en las regiones V conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes de complementaridad (CDR) que están directamente implicada en la unión de antígenos. Partiendo desde el extremo amino, estas regiones se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las CDR son mantenidas en su lugar por
25 regiones de estructura más conservadas (FR). Partiendo desde el extremo amino, estas regiones se denominan FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente. Las localizaciones de las regiones CDR y FR y un sistema de numeración han sido definidos por Kabat *et al.*, (Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991) y sus
30 actualizaciones que se pueden encontrar en Internet). Adicionalmente, los límites de las regiones CDR han sido más definidos por la nomenclatura IMGT.

Regiones variables de anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas se pueden encontrar en las SEQ ID No: 5-7 y 12-16, y se pueden obtener por humanización de BMA031, esto es, por transferencia de las CDR de BMA031 a una estructura humana. Se
35 describen dos series de anticuerpos humanizados; las series HEBE1, que comprende las SEQ ID No: 5-7, 12 y 13, y las series GL1BM, que comprenden regiones variables de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID No: 8, 15 y 16. En ambos casos la región variable de la cadena ligera utilizada es como se muestra en la SEQ ID NO: 14 (GL1BM

VK43).

Las estructuras humanas utilizadas son IGH3-23 en el caso de HEBE1 y IGHV1-3*01 e IGKV3-11*01 en el caso de GL1BM.

Las regiones constantes pueden proceder de cualesquiera regiones constantes de anticuerpos humanos. Los genes de las regiones variables se pueden clonar en vectores de expresión en un marco con genes de regiones constantes para expresar cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras. Dichos vectores de expresión se puede transfectar en células hospedantes productoras de anticuerpos para la síntesis de anticuerpos.

Regiones variables y constantes de anticuerpos humanos se pueden obtener de bases de datos de secuencias. Por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina están disponibles en la base de datos IMGT/LIGM (Giudicelli *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res.* 34: (suppl. 1):D781-D784) o VBase (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

Los anticuerpos aglicosilados pueden tener funcionalidad ampliamente modificada; véase, Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318. Una modificación "delta ab" o Δab , citada en esta memoria, es una modificación de Fc, tal como se describe en Armour *et al.*, (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624. Los métodos para modificar la glicosilación de las regiones Fc de anticuerpos son conocidas en la técnica, e incluyen medios químicos, enzimáticos y mutacionales, por ejemplo, mutación de la posición N2997 en el dominio CH_2 . Las técnicas para mutar genes de anticuerpos para producir moléculas IgG aglicosiladas se describen en Tao and Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595-2601.

"Ácidos nucleicos", tal como se denominan en la presente memoria, incluyen moléculas de DNA que codifican los anticuerpos de la invención. Se prefieren los vectores de expresión, que son adecuados para expresar los genes de anticuerpos en una célula hospedante. Los vectores de expresión y las células hospedantes para la expresión de genes de anticuerpo son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Morrow, K.J. *Genetic Engineering & Biotechnology News* (June 15, 2008) 28(12) y Backliwal, G. *et al.*, (2008) *Nucleic Acids Res.* 36(15):e96-e96.

1. Anticuerpos

La invención abarca fragmentos de unión a antígenos de los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR humanizados. Los fragmentos de los anticuerpos son capaces de unirse al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Dichos fragmentos abarcan fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y fragmentos F(v), o las cadenas pesadas o ligeras individuales de las regiones variables o una de sus porciones. Los fragmentos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen de la porción Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica a tejidos que un anticuerpo intacto. Estos fragmentos pueden ser producidos a partir de anticuerpos intactos utilizando métodos bien conocidos, por ejemplo, por escisión proteolítica con enzimas tal como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir

fragmentos $F(ab')_2$.

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan fragmentos de anticuerpo de una sola cadena (scFv) que se unen al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Un scFv comprende una región variable de la cadena pesada de anticuerpo (V_H) unida operativamente a una región variable de anticuerpo de cadena ligera (V_L), donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, juntas o individualmente, forman un sitio de unión que se une al $\alpha\beta$ TCR. Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo amino y una región V_L en el extremo carboxi. Alternativamente, un scFv puede comprender una región V_L en el extremo amino y una región V_H en el extremo carboxi. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H están codificados por genes separados, se pueden unir utilizando métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite formar una sola cadena proteica en la cual las regiones V_L y V_H se aparean formando moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv)). Un scFv puede comprender además opcionalmente un conector polipéptido entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan fragmentos de anticuerpos de dominio (dAb) como se describe en Ward, E.S. *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546, que consiste en un dominio V_H .

Los anticuerpos y fragmentos abarcan también anticuerpos de cadenas pesadas (HCAb). Se ha descrito que estos anticuerpos forman regiones de unión a antígenos utilizando solo la región variable de las cadenas pesadas, porque estos anticuerpos funcionales son dímeros de cadenas pesadas solamente (denominados "anticuerpos de cadenas pesadas" o "HCAb"). Por consiguiente, los anticuerpos y los fragmentos pueden ser anticuerpos de cadenas pesadas (HCAb) que se unen específicamente al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3.

Los anticuerpos y los fragmentos también abarcan anticuerpos que son pequeños productos inmunofarmacéuticos modulares (abreviadamente SMIP por la expresión inglesa *small modular immunopharmaceutical*) o proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominios de unión específicas para el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Estas construcciones son polipéptidos de una sola cadena que comprenden dominios de unión a antígenos fusionados a dominios de inmunoglobulinas necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpos (véase, WO 2005/017148).

Los anticuerpos y los fragmentos también abarcan diacuerpos. Estos son anticuerpos bivalentes en los cuales los dominios V_H y V_L están expresados en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y consecuentemente crea dos

sitios de unión a antígenos (véase, por ejemplo, WO 93/11161). Los anticuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El anticuerpo o uno de sus fragmentos no reacciona de forma cruzada con ninguna diana que no sea el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3.

- 5 El anticuerpo o uno de sus fragmento puede ser modificado para aumentar su semivida en suero, por ejemplo, por la adición de moléculas – tal como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros polisacáridos para aumentar la semivida.

- Los anticuerpos y sus fragmentos pueden ser biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden parecerse a anticuerpos de una sola cadena (o fragmentos de anticuerpos) pero tienen dos diferentes sitios de unión a antígenos (regiones variables).
- 10 Los anticuerpos biespecíficos se pueden obtener por varios métodos –tales como técnicas químicas, técnicas de “polidoma” o técnicas de DNA recombinantes. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener especificidades de unión por al menos dos diferentes epítomos, al menos uno de los cuales es el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. La otra especificidad
- 15 puede ser seleccionada de cualesquiera de las especificidades útiles o deseadas, incluyendo, por ejemplo, especificidad para albúmina de suero humano para la extensión de la semivida *in vivo*.

- El uso de anticuerpos biespecíficos en clínica para aplicaciones oncológicas se está haciendo realidad con el Catumaxomab (Removmab®) trifuncional aprobado para uso en
- 20 casos de ascitis maligna y el anticuerpo biespecífico Blinatumomab ahora en fase de pruebas II en neoplasias hematológicas. Estas moléculas tienen en común un brazo de unión que las une a linfocitos T y un segundo brazo que las une a la célula diana tumoral lo que da como resultado la lisis mediada por linfocitos T de la diana tumoral. También en común, estas moléculas reclutan linfocitos T por medio de la proteína CD3 localizada en
- 25 la superficie celular. Una alternativa para el reclutamiento por medio de la CD3 es hacer uso del receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$ TCR) que se expresa también en la superficie de la célula. Por consiguiente, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizados para desarrollar anticuerpos anti-tumorales combinando una especificidad para antígenos asociados a un tumor con una especificidad del receptor de linfocitos T $\alpha\beta$
- 30 ($\alpha\beta$ TCR).

2. Producción de anticuerpos

- Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de los anticuerpos descritos en la presente memoria se representa en las SEQ ID No: 5-7 y 12-16. La producción de anticuerpos se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo en
- 35 organismos transgénicos tales como cabras (véase, Pollock *et al.*, (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157), pollos (véase, Morrow, K.J.J. (2000) *Genet. Eng. News* 20:1-55), ratones (véase, Pollock *et al.*, *supra*) o plantas (véanse, Doran, P.M. (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11:199-204, Ma. J.K-C. (1998) *Nat. Med.* 4:601-606, Baez, J. *et*

al., (2000) *BioPharm.* 13:50-54, Stoger, E. *et al.*, (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590). Los anticuerpos se pueden producir también por síntesis química o por expresión de genes que codifican los anticuerpos en células hospedantes.

Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en una construcción o vector replicable, tal como un plásmido, para la propagación o expresión posterior en una célula hospedante. Las construcciones o vectores (por ejemplo, vectores de expresión) adecuados para la expresión de una inmunoglobulina humanizada de acuerdo con las realizaciones descritas están disponibles en la técnica. Está disponible una variedad de vectores, incluyendo vectores que son mantenidos en una sola copia o múltiples copias en una célula hospedante, o que llegan a integrarse en el/los cromosomas de la célula hospedante. Las construcciones o los vectores pueden ser introducidos en una célula hospedante adecuada, y las células que expresan una inmunoglobulina humanizada pueden ser producidas y mantenidas en cultivo. Se pueden utilizar para la expresión de una inmunoglobulina humanizada un único vector o múltiples vectores.

Los polinucleótidos que codifican el anticuerpo se aíslan fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótidos). Los vectores que se pueden utilizar incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas de los cuales los plásmidos son una realización típica. Generalmente, dichos vectores incluyen además una secuencia de señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidos operativamente a la cadena de polinucleótido ligera y/o pesada con el fin de facilitar la expresión. Los polinucleótidos que codifican las cadenas ligeras y pesadas pueden ser insertados en vectores separados e introducidos (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula hospedante simultánea o secuencialmente o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden ser insertadas en el mismo vector antes de dicha introducción.

Se puede proporcionar un promotor para expresión en una célula hospedante adecuada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede estar operativamente unido a un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina humanizada o una cadena de inmunoglobulina, de tal modo que dirige la expresión del polipéptido codificado. Está disponible una variedad de promotores adecuados para hospedantes procarióticos y eucarióticos. Los promotores procarióticos incluyen los promotores *lac*, *tac* T3, T7 para *E coli*; 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato Descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfoglicerato-mutasa y glucoquinasa. Los promotores eucarióticos incluyen promotores inducibles de levadura, tales como alcohol-deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa

ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o utilización de maltosa/galactosa; promotores de RNA-polimerasa II incluyendo promotores virales, tales como polioma, viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular, el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor de virus de sarcoma de Rous (RSV) y virus 40 de los simios temprano o tardío y promotores no virales, tal como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) *Nucleic Acids Res.* 18 (17): 5322). Los expertos en la técnica podrán seleccionar el promotor adecuado para expresar un anticuerpo humanizado o una de sus porciones.

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para expresión en células de eucariotas superiores, se pueden incluir elementos potenciadores adicionales en lugar de, o así como, los encontrados localizados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamíferos adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina fetoproteína, metalotioneína e insulina. Alternativamente, se puede utilizar un elemento potenciador de un virus de células eucariotas, tal como el potenciador SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, el potenciador baculoviral o el locus IgG2a de muridos (véase, WO 04/009823). Aunque tales potenciadores se encuentran frecuentemente localizados en el vector en un sitio aguas arriba del promotor, también pueden estar localizados en otro lugar, por ejemplo, dentro de la región no traducida o aguas abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posición del potenciador pueden estar basadas en la compatibilidad con la célula hospedante utilizada para la expresión.

Además, los vectores (por ejemplo, vectores de expresión) pueden comprender un marcador seleccionable para la selección de células hospedante portadoras del vector y, en el caso de un vector replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos son marcadores seleccionables comunes y pueden usarse en células procarióticas (por ejemplo, gen de f3-lactamasa (resistencia a la ampicilina), gen Tet (resistencia a la tetraciclina) y células eucarióticas (por ejemplo, neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o genes de resistencia a la higromicina). Los genes marcadores de dihidrofolato-reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de hospedantes. Los genes que codifican el producto génico de marcadores auxotróficos del hospedante (por ejemplo, LEU2, URA3, HIS3) se utilizan frecuentemente como marcadores seleccionables en levadura. También se considera el uso de vectores virales (por ejemplo, baculovirus) o de vectores fagos y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula hospedante, tales como vectores retrovirales.

En sistemas eucarióticos, señales de poliadenilación y de terminación están unidas operativamente al polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención. Dichas

señales están típicamente localizadas en la posición 3' del marco de lectura abierto. En sistemas mamíferos, ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de hormonas del crecimiento, factor-1 alfa de elongación y genes virales (por ejemplo, SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En sistemas de

5 levadura, ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de fosfoglicerato-quinasa (PGK) y genes de alcohol-deshidrogenasa 1 (ADH). En sistemas procarióticos las señales de poliadenilación no se requieren normalmente y en su lugar es habitual emplear secuencias de terminación más cortas y más definidas. La elección de secuencias de poliadenilación/terminación puede estar basada en la

10 compatibilidad con la célula hospedante utilizada para expresión. Adicionalmente a lo arriba mencionado, otras características que pueden ser empleadas para potenciar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de la cromatina, intrones y modificación de codones específicos de la célula hospedante. El uso de codones de los anticuerpos de la invención puede ser modificado para acomodar el sesgo de codones de la célula

15 hospedante de tal modo que aumente el rendimiento del transcrito y/o del producto (por ejemplo, Hoekema, A. *et al.*, (1987) *Mol. Cell Biol.* 7(8):2914-24). La elección de codones puede basarse en la compatibilidad con la célula hospedante utilizada para expresión. La invención por lo tanto se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las inmunoglobulinas humanizadas, o sus cadenas pesadas o ligeras. La invención

20 también se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una porción de unión a antígenos de las inmunoglobulinas y sus cadenas. Los anticuerpos pueden ser producidos, por ejemplo, por la expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican el anticuerpo en una célula hospedante adecuada. La célula hospedante puede ser producida utilizando cualquier método

25 adecuado. Por ejemplo, las construcciones de expresión (por ejemplo, uno o más vectores, por ejemplo, un vector de expresión en célula de mamífero) descritas en la presente memoria pueden ser introducidas en una célula hospedante adecuada y la célula resultante puede ser mantenida (por ejemplo, en cultivo, en un animal, en una planta) bajo condiciones adecuadas para expresión de la o las construcciones o del o de los vectores.

30 Las células hospedante pueden ser procarióticas, incluyendo células bacterianas tal como *E. coli* (por ejemplo, la cepa DH5a™) (Invitrogen, Carlsbad, CA), PERC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucarióticas, tales como células fúngicas o de levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), u otras células

35 eucarióticas inferiores, y células eucarióticas superiores, tales como las de insectos (por ejemplo, células de *Drosophila* Schnieder S2, células de insecto Sf9) (documento WO 94/126087 (O'Connor)), células de insectos BTI-TN-5B1-4 (High Five™) (Invitrogen), células de mamíferos (por ejemplo, células COS, tales como COS-1 (ATCC N° de acceso

CRL-1650) y COS-7 (ATCC N° de acceso CRL-1651), CHO (por ejemplo, ATCC N° de acceso CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (7):4216-4220), 293 (ATCC N° de acceso CRL-1573), HeLa (ATCC N° de acceso CCL-2), CVI (ATCC N° de acceso CCL-70), WOP (Dailey, L., et al., (1985) *J. Virol.*, 54:739-749), 3T3, 293T (Pear, W.S., et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8392-8396), células NSO, células SP2/0, células HuT 78 y similares, o plantas (por ejemplo, tabaco, lemna (lenteja de agua), y algas). Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993). En algunas realizaciones, la célula hospedante no es parte de un organismo multicelular (por ejemplo, planta o animal), por ejemplo, es una célula hospedante aislada o es parte de un cultivo celular.

Las células hospedante pueden ser cultivadas en matraces giratorios, matraces de agitación, frascos rodantes, reactores de onda (por ejemplo, Sistema 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibras huecas, pero se prefiere para producción a gran escala que se utilicen particularmente reactores de tipo depósito agitado o reactores de bolsa (por ejemplo, Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA) para cultivos en suspensión. Los reactores de tipo depósito agitado pueden ser adaptados para aireación utilizando por ejemplo rociadores, deflectores o impulsores de bajo cizallamiento. Para las columnas de burbujeo y reactores agitados por aire, se puede utilizar la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células hospedantes se cultivan en un medio de cultivo libre de suero, el medio puede ser complementado con un agente protector de las células, tal como Pluronic F-68, para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula hospedante, se pueden utilizar microportadores como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de anclaje, o se pueden adaptar las células al cultivo en suspensión. El cultivo de células hospedantes, particularmente células hospedantes de vertebrados, puede utilizar una variedad de modos operativos, tales como lotes, lotes alimentados, procesamiento repetido de lotes (véase, Drapeau *et al.*, (1994) *Cytotechnology* 15:103-109), proceso extendido de lotes o cultivo en perfusión. Aunque las células hospedantes de mamífero recombinantemente transformadas pueden ser cultivadas en medios que contienen suero, comprendiendo dichos medios suero fetal de ternera (FCS), se prefiere que dichas células hospedantes sean cultivadas en medios exentos de suero, tal como se describe en Keen *et al.*, (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, o medios comercialmente disponibles, tal como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), complementados, cuando sea necesario, con una fuente de energía, tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos, tal como insulina recombinante. El cultivo exento de suero de células hospedantes puede requerir que dichas células sean adaptadas para crecer en condiciones exentas de suero. Un método de adaptación es cultivar dichas células

hospedantes en medios que contengan suero y repetidamente intercambiar 80% del medio de cultivo por medios exentos de suero, de modo que las células hospedantes aprendan a adaptarse a las condiciones exentas de suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg, K. *et al.*, (1995) *Animal Cell Technology: Developments Towards the 21st Century* (Beuvery, E.C. *et al.*, eds), pp.619-623, Kluwer Academic Publishers).

Los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas pueden ser secretados en el medio y recuperados y purificados del mismo utilizando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso pretendido. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de pacientes humanos requiere típicamente al menos 95% de pureza determinada por SDS-PAGE reductora, más típicamente 98% o 99% de pureza, en comparación con los medios de cultivo que comprenden los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, los residuos celulares de los medios de cultivo pueden ser separados utilizando centrifugación seguida por una etapa de clarificación del líquido sobrenadante utilizando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración intensa. Alternativamente, el anticuerpo puede ser recolectado por microfiltración, ultrafiltración o filtración intensa sin centrifugación previa. Se dispone de una variedad de otras técnicas como la diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas, tales como en hidroxipatita (HA), cromatografía de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de etiqueta de afinidad, tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (véase, la Patente de EE.UU. 5.429.746). En una realización, los anticuerpos, después de diversas etapas de clarificación, son capturados utilizando cromatografía de afinidad con proteína A o G seguida por más etapas de cromatografía, tales como intercambio de iones y/o cromatografía en HA, de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión por tamaños y precipitación con sulfato de amonio. Se pueden emplear también varias etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración que usa, por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas se obtiene una preparación purificada que comprende al menos 10 mg/mL o mayor, por ejemplo, 100 mg/mL o mayor del anticuerpo de la invención y, consecuentemente, forma otra realización de la invención. Por ultracentrifugación se puede generar una concentración de 100 mg/mL o mayor. Dichas preparaciones están sustancialmente exentas de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos están localizados intracelularmente o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles pueden ser extraídas y replegadas para formar proteínas activas de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, véase, Sánchez *et al.*, (1999) *J. Biotechnol.* 72:13-20; Cupit, P.M. *et al.*, (1999) *Let. Appl. Microbiol.* 29:273-277.

La presente invención se refiere también a células que comprenden un ácido nucleico, por

ejemplo, un vector, de la invención (por ejemplo, un vector de expresión). Por ejemplo, un ácido nucleico (es decir, uno o más ácidos nucleicos) que codifica las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humanizada de acuerdo con las realizaciones descritas o una construcción (es decir, una o más construcciones, por ejemplo, uno o más vectores) que comprende dicho(a) ácido(s) nucleico(s), pueden ser introducidos en una célula hospedante adecuada por un método apropiado para la célula hospedante seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), estando o llegando a estar el(los) ácido(s) nucleico(s) unido(s) operativamente a uno o más elementos de control de la expresión (por ejemplo, en un vector, en una construcción creada por procesos en la célula, integrados en el genoma de la célula hospedante). Las células hospedantes pueden ser mantenidas bajo condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de un inductor, medios adecuados complementados con sales factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc. apropiados), con lo cual se produce(n) el(los) polipéptido(s) codificado(s). Si se desea, el anticuerpo humanizado codificado puede ser aislado, por ejemplo, de las células hospedantes, medio de cultivo o leche. Este proceso abarca la expresión en una célula hospedante (por ejemplo, una célula de glándula mamaria) de un animal o planta transgénico (por ejemplo, tabaco) (véase el documento WO 92/03918).

3. Aplicaciones terapéuticas

La supresión de la actividad de los linfocitos T es deseable en un número de situaciones en las que esté justificada la inmunosupresión y/o cuando se presenta un estado autoinmunitario. Consecuentemente, está indicado que el complejo $\alpha\beta\text{TCR.CD3}$ sea la diana en el tratamiento de enfermedades que implican una respuesta inmunitaria inapropiada o no deseada, tal como inflamación, autoinmunidad y otros estados que implican dichos mecanismos. En una realización, dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmunitaria y/o inflamatoria. Ejemplos de dichas enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias son lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (incluyendo colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC)), esclerosis múltiple (EM), esclerodermia y diabetes de tipo 1 (DT1) y otras enfermedades y trastornos, tal como PV (pénfigo vulgar), psoriasis, dermatitis atópica, enfermedad celíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Sjogren, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, polimialgia reumática, fenómeno de Raynaud, arteritis temporal, arteritis de células gigantes, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, enfermedad de Behcet, cirrosis biliar primaria, uveítis, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave,

polimiositis, alopecia areata y vitiligo.

En una realización, dicha enfermedad o trastorno es LES, AR o EII. En una realización, dicha enfermedad o trastorno es EM.

En otra realización, los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas se utilizan para ayudar en trasplantes por inmunosupresión del sujeto. Dicho uso alivia la enfermedad de injerto frente a hospedante. Para una descripción de los tratamientos existentes para la enfermedad de injerto frente a hospedante, véase, por ejemplo, Svennilson, *Bone Marrow Transplantation* (2005) 35:S65–S67, y las referencias citadas en dicho texto. Ventajosamente, los anticuerpos de la invención pueden ser usados en combinación con otras terapias disponibles.

Con relación al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, la terapia de combinación puede incluir la administración de un anticuerpo de la presente invención junto con un medicamento, que junto con el anticuerpo comprende una cantidad eficaz para prevenir o tratar dichas enfermedades autoinmunitarias. Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es diabetes de tipo 1, la terapia de combinación puede abarcar uno o más agentes que promueva el crecimiento de células beta pancreáticas o mejore el trasplante de células beta, tal como el crecimiento de células beta o factores de supervivencia o anticuerpos inmunomoduladores. Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide, dicha terapia de combinación puede abarcar uno o más de metotrexatos, un anticuerpo anti-TNF- β , una proteína de fusión receptor de TNF- β -Ig, un anticuerpo anti-IL-15 o anti-IL-21, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) o un fármaco antirreumático modificador de enfermedad (FARME). Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente biológico tal como un agente anti-TNF (por ejemplo, Enbrel®, infliximab (Remicade®) y adalimumab (Humira®) o rituximab (Rituxan®). Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es rechazo de trasplante hematopoyético, se puede(n) administrar factor(es) de crecimiento hematopoyético(s) (tales como eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-11, trombopoyetina, etc.) o agente(s) antimicrobiano(s) (tales como fármacos antibióticos, antivirales, antifúngicos). Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria sea psoriasis, el agente adicional puede ser uno o más de alquitrán y sus derivados, fototerapia, corticosteroides, ciclosporina A, análogos de vitamina D, metotrexato, inhibidores de proteína quinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK), así como agentes biológicos, tales como agentes anti-TNF y Rituxan®. Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria sea una enfermedad inflamatoria del intestino (EII), tal como, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, el agente adicional puede ser uno o más de aminosalicilatos, corticosteroides, inmunomoduladores, antibióticos, o agentes biológicos, tales como Remicade® y Humira®. El tratamiento de combinación puede ser llevado a cabo de cualquier forma que el experto en la técnica considere necesaria o conveniente y para los fines de esta memoria no se contemplan limitaciones con relación al orden,

cantidad, repetición o cantidad relativa de los compuestos que se han de utilizar en combinación. Consecuentemente, los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas para uso en terapia.

4. Composiciones farmacéuticas

- 5 En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, o un ligando o ligandos identificables por un método de ensayo como se define en los aspectos previos de la invención. Los ligandos pueden ser inmunoglobulinas, péptidos, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas, como se explicó en la presente memoria. Se hace referencia a ellos, 10 en la siguiente exposición, como "compuestos".

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es una composición de materia que comprende, como ingrediente activo, un compuesto o compuestos capaces de modular la actividad de los linfocitos T. El compuesto está en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable o, por ejemplo, cuando sea apropiado, uno de sus 15 análogos, forma de base libre, tautómero, enantiómero, racemato o una de sus combinaciones. Se considera que los ingredientes activos de una composición farmacéutica que comprende el ingrediente activo de acuerdo con la invención presentan actividad terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de injerto frente a hospedante, cuando se administran en una cantidad que depende del caso particular.

- 20 En otra realización, se pueden utilizar uno o más compuestos de la invención en combinación con cualquier compuesto reconocido en la técnica que se sabe que es adecuado para tratar la indicación particular en el tratamiento de cualquiera de los estados antes mencionadas. Consecuentemente, uno o más compuestos de la invención pueden ser combinados con uno o más compuestos reconocidos en la técnica que se 25 sabe que son adecuados para el tratamiento de las anteriores indicaciones, de tal modo que pueda ser administrada al sujeto una sola composición conveniente. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas o la dosis se puede ser reducir proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

- 30 El ingrediente activo se puede administrar de forma conveniente, tal como por vía oral, intravenosa (cuando sea soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o por supositorio o implante (por ejemplo, utilizando moléculas de liberación lenta).

Dependiendo de la vía de administración, se puede requerir que el ingrediente activo esté 35 recubierto con un material que proteja dichos ingredientes de la acción enzimática, ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar dicho ingrediente.

Con el fin de administrar el ingrediente activo por medios distintos de la administración parenteral, será recubierto por, o administrado con, un material que impida su

inactivación. Por ejemplo, el ingrediente activo puede ser administrado en un coadyuvante, co-administrado con inhibidores de enzimas o en liposomas. El coadyuvante se utiliza en su más amplio sentido e incluye cualquier compuesto estimulante del sistema inmunitario, tal como interferón. Los coadyuvantes considerados en la presente invención
5 incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos, tales como polioxietileno-oleil-éter y n-hexadecil-poli-etileno-éter. Los inhibidores enzimáticos incluyen tripsina pancreática. Los liposomas incluyen emulsiones CGF agua-en-aceite-en-agua así como liposomas convencionales.

El ingrediente activo se puede administrar también parenteralmente o
10 intraperitonealmente.

Las dispersiones se pueden preparar también en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de conservación y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas
15 estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que sea fácilmente inyectable. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y conservación y debe ser preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y
20 hongos. El excipiente puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), sus mezclas adecuadas y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de revestimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersión y por el uso
25 de agentes tensioactivos.

La prevención de la acción de microorganismos puede ser realizada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En ciertos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones
30 inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando un ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes antes enumerados, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se
35 preparan dispersiones incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al

vacío y la técnica de liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de su solución filtrada previamente en condicione estériles.

Otros varios materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material
5 utilizado en la preparación de cualquier forma de unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Adicionalmente, el ingrediente activo puede ser incorporado en las preparaciones y formulaciones de liberación prolongada.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que
15 cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se considera su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos complementarios.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de
20 unidad de dosificación, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para sujetos mamíferos que han de ser tratados; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las nuevas formas unitarias de dosificación
25 de la invención está dictada por, y depende directamente de: (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que se ha de conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer dicho material activo para el tratamiento de la enfermedad en sujetos vivos que tienen un estado morbooso en el que está alterada la salud corporal.

30 Los principales ingredientes activos se mezclan para una administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en forma de unidad de dosificación. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos complementarios, las dosis están determinadas por referencia a la dosis usual y al modo de administración de dichos ingredientes.

35 Para facilitar la administración de compuestos peptídicos, incluyendo anticuerpos, a las células, los péptidos pueden ser modificados para mejorar su capacidad para cruzar una membrana celular. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.149.782 describe el uso de péptidos fusogénico, péptidos formadores de canales iónicos, péptidos de membrana,

ácidos grasos de cadena larga y otros agentes de mezcla para membranas para aumentar el transporte de proteínas a través de la membrana celular. Estos y otros métodos también están descritos en el documento WO 97/37016 y en la patente de EE.UU. 5.108.921, incorporados en la presente memoria como referencia.

- 5 En un aspecto adicional se proporciona el ingrediente activo de la invención como se ha definido antes para su uso en el tratamiento de una enfermedad, ya sea solo o en combinación con compuestos reconocidos en la técnica que se sabe que son adecuados para el tratamiento de la indicación particular. Consecuentemente se proporciona el uso de un ingrediente activo de la invención para la fabricación de un medicamento para el
- 10 tratamiento de una enfermedad asociada con una respuesta inmunitaria anómala.
- Además, se proporciona un método para el tratamiento de un estado asociado con una respuesta inmunitaria anómala, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando identificable utilizando un método de ensayo como se ha descrito anteriormente. La invención se describe adicionalmente, solamente con
- 15 fines de ilustración, en los siguientes ejemplos.

Ejemplo Comparativo 1

La unión y la actividad biológica de EuCIV3 es menor en comparación con el BMA031

- Utilizando citometría de flujo, los inventores han demostrado que EuCIV3 es inferior a
- 20 BMA031 en la unión a linfocitos T (Fig. 1). En este ensayo de competencia, los linfocitos T fueron incubados en hielo en presencia de una concentración fija de MolgG2b-BMA031 marcado directamente con ficoeritrina (competidor de múridos) y una concentración creciente de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR. Después de 20 minutos de incubación, se lavaron las células y se detectó por citometría de flujo el MolgG2b-BMA031 marcado directamente
- 25 con ficoeritrina unido a la superficie. El anticuerpo quimérico BMA031 HulgG1 compite mucho más eficazmente que EuCIV3.

- Para determinar su capacidad para inhibir *in vivo* la actividad de los linfocitos T, se trataron linfocitos T CD8+ con anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR en varias concentraciones (véase la Fig. 2, eje x) y se cultivaron conjuntamente con células dendríticas (CD)
- 30 autólogas pulsadas con el péptido de CMV 495-503 (pp65) durante siete días en un ensayo de aprendizaje *in vitro* (IVE).

- Se obtuvieron productos de aféresis de donantes normales de individuos HLA-A2* de HemaCare Corp., Van Nuys, CA). Se aislaron PBMC por centrifugación sobre Ficoll (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se aislaron linfocitos T CD8+ utilizando perlas magnéticas
- 35 (Invitrogen, Carlsbad, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para generar células dendríticas autólogas inmaduras, las PBMC se pusieron de nuevo en suspensión en RPMI 1640/suero AB humano al 5 % (Sigma), se sembraron en matraces triples (Corning) y se incubaron durante más de 2 horas a 37°C/CO₂ al 5%. Se lavaron

luego los monocitos adherentes con PBS y se cultivaron durante 6 días en RPMI 1640/suero AB humano al 5% complementado con GM-CSF (Immunex, Seattle, WA) e IL-4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Antes de establecer cultivos conjuntos de linfocitos T/DC, los DC fueron pulsados con péptidos (10 µg/mL) durante 4 horas y luego se dejaron madurar. Se generaron células dendríticas maduras por adición de 50 ng/mL de TNF-alfa, 25 ng/mL de IL-1β, 10 ng/mL de IL-6, 500 ng/mL de PGE-2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) y se cultivaron las células dendríticas durante otras 24 horas. Las DC pulsadas con péptidos se añadieron luego a los linfocitos T CD8+ previamente aislados a una relación de T:DC de 10:1. Los cultivos fueron inmediatamente alimentados con IL-2 (100 UI/mL) añadida a los cultivos. Los cultivos fueron complementados con IL-2 (100 UI/mL) en el día 4. Los cultivos a granel se analizaron para determinar la reactividad de péptidos en un ensayo de liberación de cromo el día 7.

El gráfico de la Fig. 2 muestra los datos de lisis de un ensayo de liberación de cromo, donde los linfocitos T no tratados fueron sometidos a aprendizaje satisfactoriamente frente al péptido pp65 y fueron capaces de lisar dianas específicas en >50%. El BMA031 inhibió el aprendizaje de estos linfocitos T, puesto que no fueron capaces de lisar las dianas específicas de una manera dependiente de la dosis. El anticuerpo humanizado EuCIV3 fue menos potente que BMA031 y sólo fue capaz de inhibir el aprendizaje a la dosis más alta.

Ejemplo 2

Modificación por ingeniería de Fc de anticuerpos BMA031 quiméricos

Perfil in vitro

Los inventores determinaron el perfil *in vitro* de BMA031 en un panel de ensayos. La Tabla 1 muestra el perfil *in vitro* de BMA031. En estos ensayos BMA031 se compara con OKT3.

En el ensayo de proliferación de PBMC, se cultivaron PBMC humanas con concentraciones crecientes de anticuerpo terapéutico durante 72 horas. Se añadió ³H-timidina y se recolectaron las células 18 horas después.

Para el ensayo de agotamiento de linfocitos T/liberación de citoquinas, se cultivaron PBMC humanas con concentraciones crecientes de anticuerpo terapéutico y se analizaron diariamente para el recuento y viabilidad celular (Vi-Cell, Beckman Coulter) hasta el día 7. Se recogieron también los líquidos sobrenadantes de las células, se conservaron a -20°C y se analizaron en un panel de citoquinas 8-plex (Bio-Rad).

El BMA031 no induce: (i) la proliferación de PBMC; (ii) el agotamiento de linfocitos T; (iii) la expresión de CD25; o (iv) la liberación de citoquinas. En contraste, OKT3 sí induce todos los efectos antes mencionados. BMA031 y OKT3 son capaces de bloquear el aprendizaje de células CD8+ frente a péptido en un ensayo de aprendizaje *in vitro* (IVE) y son también capaces de bloquear una reacción de linfocitos mixtos (MLR). BMA031

también induce apoptosis de linfocitos T activados (muerte celular inducida por activación; AICD).

A diferencia del BMA031, una versión quimérica de MBA031 (HulgG1), con una región constante de IgG1 humana de tipo natural, tuvo un perfil *in vitro* comparable con OKT3 (Tabla 1). Los inventores postularon que la participación de FcγR fue crítica para este cambio del perfil *in vitro* para HulgG1 BMA031 en comparación con BMA031 MolgG2B. Por lo tanto los inventores prepararon fragmentos F(ab')₂ de BMA031 HulgG1 y encontraron que estos recuperan el perfil de BMA031 MolgG2b. Por ingeniería de Fc los inventores incorporaron modificaciones que eliminan la unión de FcγR en mutaciones conocidas como "delta ab" (Armour *et al.*, (1999) *Eur. J. Immunol.*, 29:2613-2624) y generaron una forma aglicosilada de HulgG4 (N297Q). Los anticuerpos anti-αβTCR HulgG1 delta ab y HulgG4 Agly tenían el mismo perfil *in vitro* que BMA031 MolgG2b (Tabla 1).

	PBMC normales							Linfocitos T activados		
	Unión a γδTCR	Unión a αβTCR	Unión a αβTCR	Proliferación	Agotamiento	Expresión de	Liberación	Inhibición de	Apoptosis/	Inhibición de
OKT3	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
BMA031 MolgG2b	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
BMA031 HulgG1	-	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
BMA031 F(ab) ₂	-	+	-	-	-	-	-	ND	ND	+
BMA031 Δab	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
HEBE1 Δab	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
HEBE1 IgG4 Agly	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Tabla 1

Ejemplo 3
Construcción de anticuerpos humanizados con unión mejorada

Los inventores generaron dos series de versiones humanizadas de BMA031 denominadas serie HEBE1 (IGH3-23) y serie GL1BM (IGHV1-3*01 & IGKV3-11*01; véase, VBase, vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk). El injerto inicial de regiones CDR de la cadena pesada de BMA031 en regiones estructurales de IGH3-23 (véase, las SEQ ID No: 5 y 6) mejoró la unión del anticuerpo al αβTCR como se muestra por un ensayo de competencia (Fig. 3); véase, el Ejemplo 2. Sin embargo, esta mejora no se tradujo en una mejora funcional en el anticuerpo como se muestra en un ensayo IVE (Fig. 4).

Ejemplo 4
Optimización de anticuerpos humanizados

La estrategia para la optimización de los anticuerpos humanizados se basó en la mutagénesis y el cribado funcional. La optimización se inició con cambios de bloques de

residuos de aminoácidos en una de cada una de las cuatro regiones estructurales de los dominios variables de ratón a humano. Se identificaron regiones estructurales clave en cada una de las series GL1BM HC, GL1BM LC y HEBE1 HC. Después de esta identificación, residuos individuales dentro de dichas regiones estructurales fueron

5 mutados a residuos de líneas germinales humanas a partir de la secuencia original de ratón. Los residuos de la estructura para los que se encontró que la identidad con la secuencia de ratón es importante para retener las propiedades de unión del anticuerpo se retuvieron como residuos de ratón. De otra manera, se cambiaron residuos de estructura para que coincidan con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana. Esto

10 se continuó a través de la secuencia hasta que fue identificado el número mínimo de residuos de ratón para retener las propiedades de unión originales del anticuerpo. Véase la Fig. 5. Los inventores han demostrado que varios de los anticuerpos de estas series tienen una unión mejorada en comparación con el BMA031, tal como se determina por la disociación del anticuerpo de los linfocitos T (Figs. 6, 7 y 8).

15 Para los ensayos de disociación, se incubaron 10^5 linfocitos T humanos durante 30-60 minutos a temperatura ambiente en 100 μ L de medio de cultivo completo que contenía 2 μ g/mL de los anticuerpos expresados como HulgG1- Δ ab. Se lavaron luego las células, se pusieron de nuevo en suspensión en 50 μ L de medio de cultivo completo y se añadieron 20 μ g/mL de HEBE1 F(ab')₂ para impedir la nueva unión de los anticuerpos candidatos

20 disociados. Una vez finalizado el tiempo de ensayo, se fijaron las células y el nivel de anticuerpo HulgG1- Δ ab restante unido a la superficie celular se midió por citometría de flujo por medio de un anticuerpo secundario anti-HulgG de cabra marcado con PE. Los inventores demostraron también que los anticuerpos son activos en la prevención de la respuesta inmunitaria en un ensayo IVE (Figs. 9, 10 y 11) y un ensayo MLR. En el

25 ensayo IVE, se usó la unión de un tetrámero como una medida cuantitativa para el IVE. El porcentaje de células que fueron específicas de antígeno se determinó por tinción de los linfocitos T con un tetrámero marcado directamente que es específico para el péptido de aprendizaje. Brevemente, los linfocitos T CD8⁺ en el día 7 del ensayo IVE se tiñeron con tetrámero por protocolos estándares de tinción de citometría de flujo y se analizaron en

30 BD FACSCalibur. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados demostraron niveles comparables de potencial proliferante en las PBMC y liberación de citoquinas en comparación con el BMA031 (Figs. 12 y 13).

Los anticuerpos también mostraron capacidad para inhibir la liberación de IFN γ de linfocitos T en un ensayo IVE (Fig. 14). Adicionalmente, los inventores han demostrado

35 que un número de estos anticuerpos tiene mejor capacidad para provocar la muerte celular inducida por activación (AICD) de linfocitos T positivos a $\alpha\beta$ TCR activados en comparación con el BMA031 (Fig. 15). En el ensayo AICD, se cultivaron linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos con anticuerpo terapéutico. A las 24 horas, 48 horas y 72 horas

las células se tiñeron con los marcadores de apoptosis Annexin-V y 7-AAD. Las células también se tiñeron con tetrámero para seguir la apoptosis con efectos en los linfocitos T específicos de antígenos.

En conclusión, los inventores han mejorado significativamente los intentos previos de humanizar BMA031. El descubrimiento de anticuerpos con una mejor disociación en comparación con BMA031 es un descubrimiento inesperado por medio de este proceso. Esta mejora en la unión está correlacionada con una mejora en la potencia para suprimir una respuesta inmunitaria, como se demuestra en el ensayo IVE (Figs. 10 y 11). La especificidad de los anticuerpos para $\alpha\beta$ TCR, la inmunogenicidad disminuida por humanización, la apoptosis específica de linfocitos T activados y la falta de activación de linfocitos T por la unión de anticuerpos hace a estos anticuerpos excelentes candidatos para fines terapéuticos.

Ejemplo 5

Generación de mutantes Fc para función efectora reducida.

Se diseñaron y generaron variantes de Fc por ingeniería cuando se introduce un sitio de glicosilación en el aminoácido Ser de la posición 298, próximo al sitio Asn297 de origen natural. La glicosilación en Asn297 se mantuvo o se desactivó por mutaciones. Las mutaciones y los resultados de la glicosilación se indican en la Tabla 2.

Nº	Mutación	Resultado predicho	Beneficio esperado
1	N297Q	Sin glicosilación	Control Agly
2	T299A	Sin glicosilación	Control Agly, función efectora
3	N297Q/S298N/Y300S	Sin glicosilación en 297 pero con sitio de glicosilación por	Función efectora reducida
4	S298N/T299A/Y300S (STY)	Sin glicosilación en 297 pero con sitio de glicosilación por	Función efectora reducida
5	S298N/Y300S (SY)	Dos sitios potenciales de glicosilación en 297 & 298; ¿doble	Control positivo para función efectora reducida

Tabla 2

Se hicieron mutaciones en la cadena pesada de del clon nº 66 del anticuerpo para el receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ por Quikchange utilizando un molde pENTR_LIC_IgG1. El dominio VH de HEBE1 Δ ab IgG1 nº66 se amplificó con cebadores LIC y se clonó en pENTR_LIC_IgG1 mutado o de tipo natural por LIC para crear mutantes Ab de longitud completa o de tipo natural. Se verificó la subclonación con doble digestión con DraIII/XhoI, produciendo un inserto de ~1250 pb en los clones satisfactorios. Los mutantes de longitud completa se clonaron luego en un vector de expresión, pCEP4(-E+I)Dest, por clonación Gateway. Las

mutaciones se confirmaron luego por secuenciación de DNA.

En la transfección HEK293 se utilizaron como controles dos construcciones, HEBE1 Agly IgG4 y HEBE1 Δ ab IgG1 en pCEP4. Los mutantes naturales y los controles (Agly y Δ ab) se transfectaron en células HEK293-EBNA en un matraz triple para su expresión. Las proteínas se purificaron a partir de 160 mL de medio acondicionado (CM) con columnas con 1 mL de HiTrap proteína A (GE) en una bomba peristáltica multicanal. Se analizaron cinco microgramos de cada líquido sobrenadante en SDS-PAGE reductora y no reductora con Tris-glicina al 4-20% (véase la Figura 16). La cadena pesada de los mutantes aglicosilados (N297Q, T299A y control Agly) es menor (flecha en negro), consistente con la pérdida de glicanos en estos anticuerpos. Las cadenas pesadas de los anticuerpos aglicosilados por ingeniería (NSY, STY, SY, Δ ab y el control natural, flechas en rojo), sin embargo, migran de la misma manera que el control de tipo natural. Este resultado está de acuerdo con el resultado esperado del sitio de glicosilación por ingeniería en las posiciones 298. El análisis por SEC-HPLC indicó que todos los mutantes se expresaron como monómeros.

Análisis de glicosilación por LC-MS.

Las variantes H66 IgG1 Fc modificadas por ingeniería se redujeron parcialmente con DTT 20 mM a 37°C durante 30 minutos. Las muestras se analizaron por LC capilar/MS en un sistema de HPLC capilar Agilent 1100 acoplado con un sistema híbrido QSTAR qq TOF (Applied Biosystem). Se utilizó para el análisis de datos la reconstrucción Bayesiana de proteínas con corrección de la línea base y modelado por ordenador en Analyst QS 1,1 (Applied Biosystem). Para la parte delantera del anticuerpo S298N/T299A/Y300S H66 mutante, se observó un sitio de glicosilación en el aminoácido 298 con glicanos de tipos complejos bi-antenarios y tri-antenarios detectados como las especies principales, así como G0F, G1F y G2F.

Unión de mutantes del anticuerpo para $\alpha\beta$ TCR a Fc γ RIIIa y FcRI humanos utilizando Biacore.

Se utilizó Biacore para evaluar la unión a Fc γ RIIIa (V158 & F158) y Fc γ RI humanos recombinantes. Las 4 celdillas de flujo de un chip CM5 se inmovilizaron con anticuerpo anti-HPC4 mediante el procedimiento de acoplamiento estándar por amina proporcionado por Biacore. El anticuerpo anti-HPC4 se diluyó hasta 50 μ g/mL en acetato de sodio 10 mM a pH 5,0 para la reacción de acoplamiento y se inyectó durante 25 minutos a 5 μ L/min. Se inmovilizaron aproximadamente 12.000 unidades reactivas (UR) de anticuerpo en la superficie del chip. Se diluyeron Fc γ RIIIa-V158 y Fc γ RIIIa-F158 humanos recombinantes hasta 0,6 μ g/mL en tampón de unión, HBS-P con CaCl₂ 1 mM, y se inyectaron en las celdillas de flujo 2 y 4, respectivamente, durante 3 minutos a 5 μ L/min para capturar 300-400 UR de receptor en el chip anti-HPC4. Para distinguir entre los agentes de débil unión, se capturó tres veces más de rhFc γ RIIIa en la superficie del anti-HPC4 que por lo general

fue utilizado en este ensayo. Las celdillas de flujo 1 y 3 se utilizaron como controles de referencia. Cada anticuerpo se diluyó hasta 200 nM en tampón de unión y se inyectó en las 4 celdillas de flujo durante 4 minutos, seguido por 5 min de disociación en tampón. Las superficies se regeneraron con EDTA 10 mM en tampón HBS-EP durante 3 minutos a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Los resultados se muestran en la Figura 17.

También se utilizó Biacore para comparar la unión de Fc γ RI. El anticuerpo anti-tetra HIS se intercambió con tampón en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0 utilizando una columna de desalinación Zeba y se diluyó a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el tampón de acetato para el acoplamiento de amina. Dos celdillas de flujo de un chip CM5 se inmovilizaron con ~9000 UR del anticuerpo anti-Tetra-His después de 20 minutos de inyección a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Similar al experimento anterior, se capturó diez veces más de Fc γ RI en la superficie de anti-Tetra-His para comparar los agentes de unión débil. El Fc γ RI humano recombinante se diluyó hasta 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón de unión HBS-EP y se inyectó en la celdilla de flujo 2 durante 1 minuto a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ para capturar ~1000 UR del receptor en el chip anti-Tetra-His. Una concentración única de anticuerpo, 100 nM, se inyectó durante 3 minutos a 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ en el receptor capturado y la superficie de control. La disociación se monitorizó durante 3 minutos. La superficie se regeneró con dos inyecciones de 30 segundos de glicina 10 mM, pH 2,5, a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Los resultados se muestran en la Figura 18.

El resultado sugiere muy poca unión de los mutantes glicomodificados por ingeniería a Fc γ R1IIa o Fc γ RI. El H66 S298N/T299A/Y300S en particular tiene casi completamente abolida la unión a ambos receptores. Este mutante fue elegido como el principal para la caracterización detallada.

Caracterización de la estabilidad utilizando dicroísmo circular (abreviadamente CD por la expresión inglesa circular dichroism).

La estabilidad del mutante del anticuerpo S298N/T299A/Y300S se monitorizó por un experimento de termofusión en un Far-UV CD, donde la señal de CD a 216 nm y 222 nm se monitorizó a medida que aumentaba la temperatura que finalmente condujo al despliegue del anticuerpo. Los espectros de CD fueron recogidos en un espectrofotómetro Jasco 815 a una concentración de proteínas de aproximadamente 0,5 mg/mL en un tampón de PBS en una cubeta de cuarzo (Hellma, Inc.) con una longitud de recorrido de 10 mm. La temperatura fue controlada por un instrumento Peltier termoeléctrico (Jasco modelo AWC100) y se elevó a una velocidad de 1°C/min desde 25-89°C. Se recogieron tanto la señal de CD como el voltaje HT. Los datos se obtuvieron desde 210-260 nm con intervalos de datos de 0,5 nm y a intervalos de temperatura de 1°C. La velocidad de escaneo fue 50 nm/min y una toma de datos de 0,5 nm. Se utilizó una anchura de banda de 2,5 nm con un ajuste de sensibilidad en el valor medio. Se realizaron 4 escaneos por

duplicado para cada muestra. El resultado sugiere que ambos mutantes, el delta AB H66 y el S298N/T299A/Y300S H66 muestran similar comportamiento térmico y tienen la misma temperatura de inicio para la degradación de alrededor de 63°C. En otras palabras, el mutante es tan estable como el formato delta AB.

5 Véase la Figura 18.

Ejemplo 6.

Análisis funcional de mutantes modificados por ingeniería de Fc.

Los ensayos de proliferación de PBMC y de liberación de citoquinas se realizaron como se expone en el Ejemplo 2. Se descongelaron PBMC de donantes normales y se trataron
10 bajo las siguientes condiciones (todas en medios que contenían complemento):

- No tratadas
- BMA031, molgG2b 10 µg/mL
- OKT3, molgG2a 10 µg/mL
- H66, hulG1 deltaAB 10 µg/mL, 1 µg/mL y 0,1 µg/mL
- 15 • H66, hulG1 S298N/T299A/Y300S 10 µg/mL, 1 µg/mL y 0,1 µg/mL

Las citoquinas se recolectaron el día 2 (D2) y el día 4 (D4) para análisis Bioplex (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFN γ , TNF α). Las células se tiñeron el D4 para la expresión de CD4, CD8, CD25 y abTCR.

Los resultados mostrados en las Figuras 19-22, demuestran que H66
20 S298N/T299A/Y300S se comportó de forma similar a la H66 deltaAB en todos los ensayos basados en células, mostrando activación mínima de linfocitos T por expresión de CD25; unión a abTCR, aunque con cinética ligeramente diferentes a delta AB; liberación mínima de citoquinas tanto el D2 como el D4; el mutante era de hecho superior a deltaAB el D4 con relación a varias de las citoquinas.

25 El mutante S298N/T299A/Y300S eliminó por tanto la función efectora tan eficazmente como la mutación deltaAB.

Ejemplo 7

Anticuerpos biespecíficos

Se construyeron moléculas biespecíficas constituidas por dos anticuerpos de una sola
30 cadena (scFv) enlazadas entre sí por medio de un corto conector de aminoácidos con lo cual un brazo es capaz de unirse a una diana tumoral y el otro es capaz de unirse a linfocitos T por medio del $\alpha\beta$ TCR. La molécula biespecífica se denomina en la presente memoria TRACER (por la expresión inglesa *T cell Receptor Activated Cytotoxic EnableR* o sea facilitador citotóxico activado por el receptor de linfocitos T).

35 Se prepararon las siguientes construcciones scFv de anti- $\alpha\beta$ TCR humanizadas:

GL1BM Δ SxVK1

GL1BM Δ SxVK27

GL1BM Δ SVH11xVK1

GL1BMΔSVH15xVK1

GL1BMΔSVH28xVK43

GL1BMΔSVH31xVK43

Las secuencias de las cadenas pesada y ligera se representan en las SEQ ID NO 14-16 y
5 20-24.

La caracterización de estas moléculas comprendía una determinación de la unión a la diana tumoral y a los linfocitos T, actividad citotóxica *in vitro* y perfil de liberación de citoquinas en presencia y ausencia de células diana tumorales.

El perfil de unión determinado por citometría de flujo muestra que los anticuerpos anti-
10 αβTCR biespecíficos son capaces de unirse tanto a la línea celular de la diana tumoral como a los linfocitos T. Véase la Figura 23.

La actividad citotóxica *in vitro* medida por citometría de flujo muestra que los linfocitos T reclutados por el anticuerpo anti-αβTCR biespecífico son capaces de inducir lisis mediada por linfocitos T. Véase la Figura 24.

15 El análisis del perfil de liberación de citoquinas ha mostrado que tras la unión de ambos brazos del anticuerpo biespecífico existe un alto nivel de liberación de citoquinas TH1/TH2 desde los linfocitos T que no se observa en ausencia de células diana. Considerados juntos estos mecanismos de acción muestran un perfil similar al de los anticuerpos biespecíficos basados en CD3 descrito en la bibliografía.

20 **Ejemplo 8: Preparación y caracterización de una variante de Fc obtenida por ingeniería en el anticuerpo anti-CD52.**

Para analizar el carácter general de la aplicabilidad de las mutaciones de Fc descritas en la presente memoria se preparó también el mutante de glicosilación S298N/Y300S en un anticuerpo anti-CD52 (clon 2C3) para observar si la modulación de la función efectora con
25 la pérdida de la unión a FcγRIII se aplica a una cadena principal de anticuerpo diferente. Se preparó por mutagénesis de cambio rápido el DNA variante de S298N/Y300S 2C3. La proteína se purificó a partir de medios acondicionados después de transfección transitoria de HEK293. En paralelo se produjo como control el anticuerpo de tipo natural anti-CD52 2C3. Se usó Biacore para caracterizar la unión al antígeno FcγRIII y las propiedades de
30 unión de los anticuerpos purificados (véase la Figura 26).

La variante S298N/Y300S 2C3 se une firmemente al péptido CD52 y el sensograma de unión es indistinguible del correspondiente al control de tipo natural, lo que sugiere que esta mutación en el dominio Fc no afecta a su unión al antígeno (Figura 26A).

Para analizar la función efectora de Fc se usó el receptor FcγRIII (Val158) en estudios de
35 unión. El mutante y el control de tipo natural se diluyeron hasta 200 nM y se inyectaron en FcγRIIIa capturado con la etiqueta HPC4. La unión a FcγRIII es casi indetectable para el mutante S298N/Y300S lo que indica pérdida de la función efectora con esta variante (Figura 26B). El mutante se une también al receptor FcRn con la misma afinidad que el

anticuerpo de control de tipo natural de modo que los inventores no esperan cambio en su semivida en circulación o en otras propiedades farmacocinéticas (véase la Figura 26C). Los inventores llegaron a la conclusión de que la mutación S298N/Y300S es aplicable en general a anticuerpos para reducir o eliminar la función efectora no deseada de Fc, por ejemplo por implicación de los receptores Fcγ humanos.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR representadas en las SEQ ID NO: 7, 12 o 13 y una estructura humana IGH3-23 representada en la SEQ ID NO: 17, donde la posición 6 de la estructura es un residuo donante.
2. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR representadas en las SEQ ID NO: 7, 12 o 13 y una estructura humana IGH3-23 representada en la SEQ ID NO: 17, donde la posición 18 de la estructura es un residuo donante.
3. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde las posiciones 49 y/o 69 de la estructura son residuos donantes.
4. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR representadas en la SEQ ID NO: 15 o 16 y una estructura IGHV1-3*01 humana representada en la SEQ ID NO: 18, donde una o más de las posiciones 38, 44 y/o 48 de la estructura es un residuo donante.
5. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR representadas en la SEQ ID NO: 15 o 16 y una estructura IGHV1-3*01 humana representada en la SEQ ID NO: 18, donde las posiciones 44 y 48 de la estructura son residuos donantes.
6. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende las CDR representadas en la SEQ ID NO: 14 y una estructura IGKV3-11*01 humana representada en la SEQ ID NO: 19, donde las posiciones 70 y/o 71 de la estructura son residuos donantes.
7. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano de acuerdo con la reivindicación 6, donde la posición 46 de la estructura es un residuo donante.
8. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de la cadena pesada seleccionada de las cadenas pesadas que comprende las secuencias de aminoácidos representadas en las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, y una secuencia de región variable de la

cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 14.

9. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de la cadena pesada seleccionada de las cadenas pesadas que comprende las secuencias de aminoácidos representadas en las SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 14.
10. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende una región constante de origen humano.
11. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además una modificación de Fc que reduce la unión al receptor de Fc γ .
12. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además una región Fc aglicosilada o una modificación delta ab.
13. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende un patrón de glicosilación modificado.
14. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende una o más de las mutaciones S298N, T299A e Y300S.
15. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende dos o más de las mutaciones N297Q, S298N, T299A e Y300S.
16. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende las mutaciones múltiples N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S o S298N/Y300S.
17. Un ácido nucleico que codifica al menos una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Una célula que expresa un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 17.
19. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para uso en la supresión de de una respuesta mediada por linfocitos T en un sujeto.
20. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 19, donde la respuesta mediada por linfocitos T está implicada en un estado seleccionado de trasplante de tejidos, incluyendo trasplante de órganos sólidos y trasplante de tejidos compuestos, injerto de tejidos, esclerosis múltiple y diabetes de tipo 1.
21. Un anticuerpo que comprende un Fc modificado, en el cual dicho Fc modificado comprende un patrón de glicosilación modificado que reduce la unión al receptor de Fc γ , que comprende una o más mutaciones S298N, T299A e Y300S.
22. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende dos o más de las mutaciones N297Q, S298N, T299A e Y300S.

23. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende las mutaciones múltiples N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S o S298N/Y300S.
24. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 10.
25. Un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos una cadena pesada de un primer dominio de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y un segundo dominio específico de unión para un antígeno específico de tumor.
26. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende
10 al menos una cadena pesada de un dominio de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 9.
27. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 25 o la reivindicación 26, que comprende un scFv del anti- $\alpha\beta$ TCR/CD3 y un scFv antitumoral.
28. Un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con una cualquiera de las
15 reivindicaciones 25 a 27, que es biespecífico.

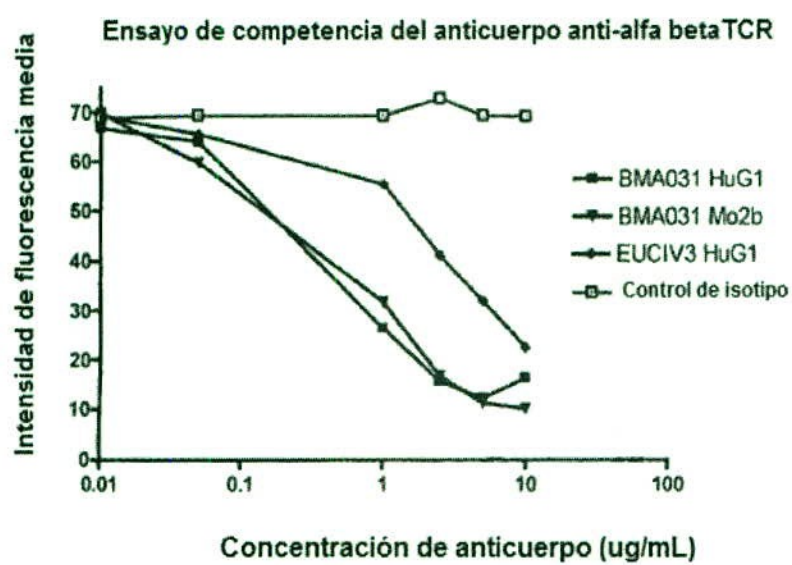


FIGURA 1

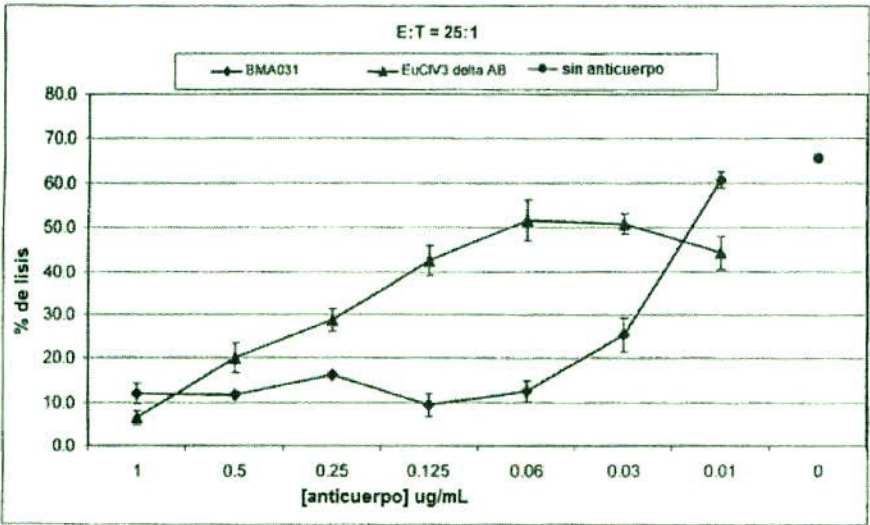


FIGURA 2

Ensayo de competencia contra GMP BMA031 Mo2b

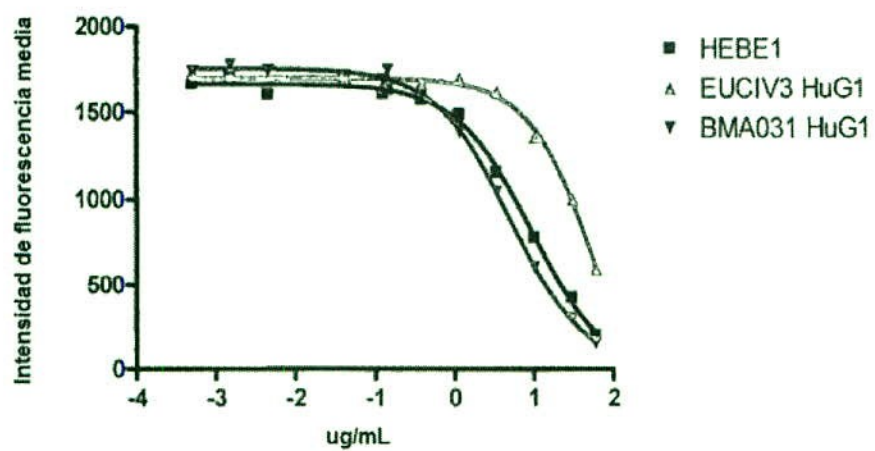


FIGURA 3

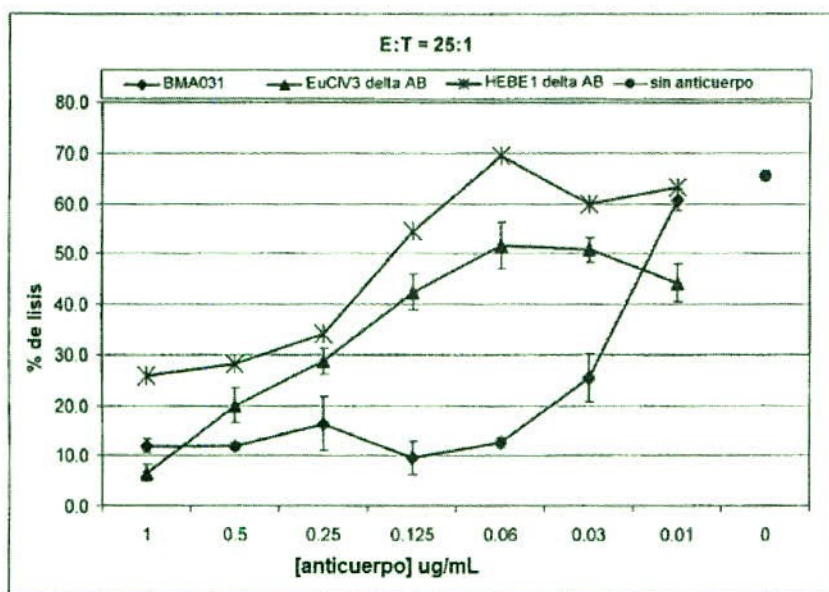


FIGURA 4

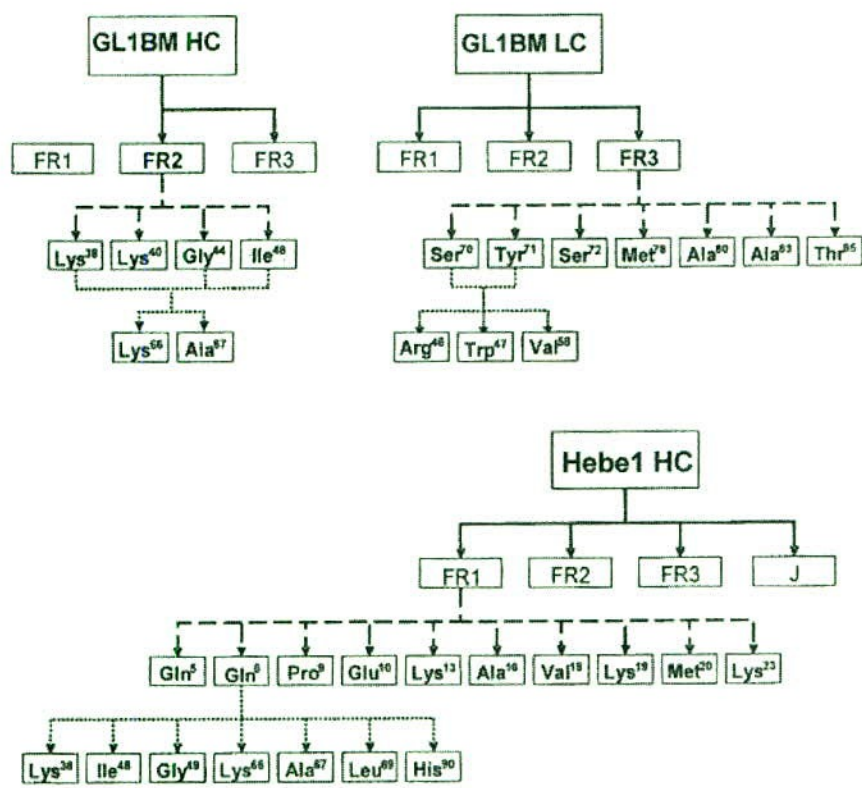


FIGURA 5

Velocidad de disociación de anticuerpos HEBE re-humanizados
Linfocitos T

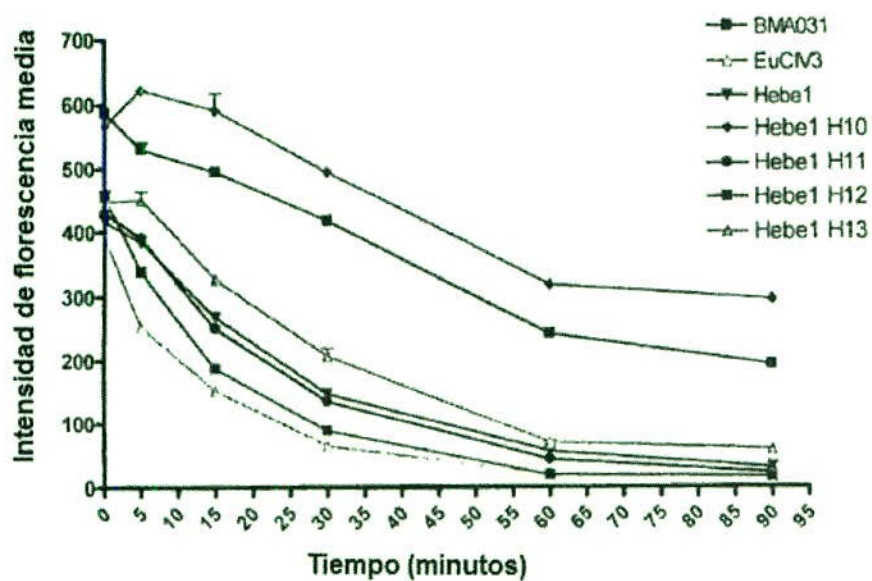


FIGURA 6

Velocidad de disociación de anticuerpos HEBE re-humanizados
Linfocitos T

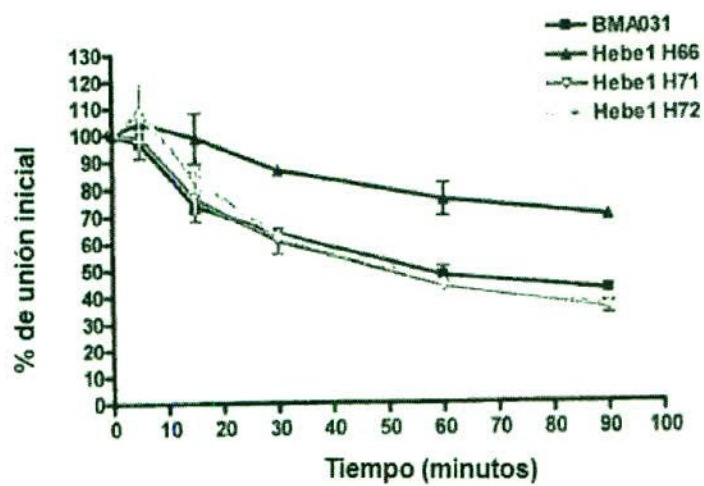


FIGURA 7

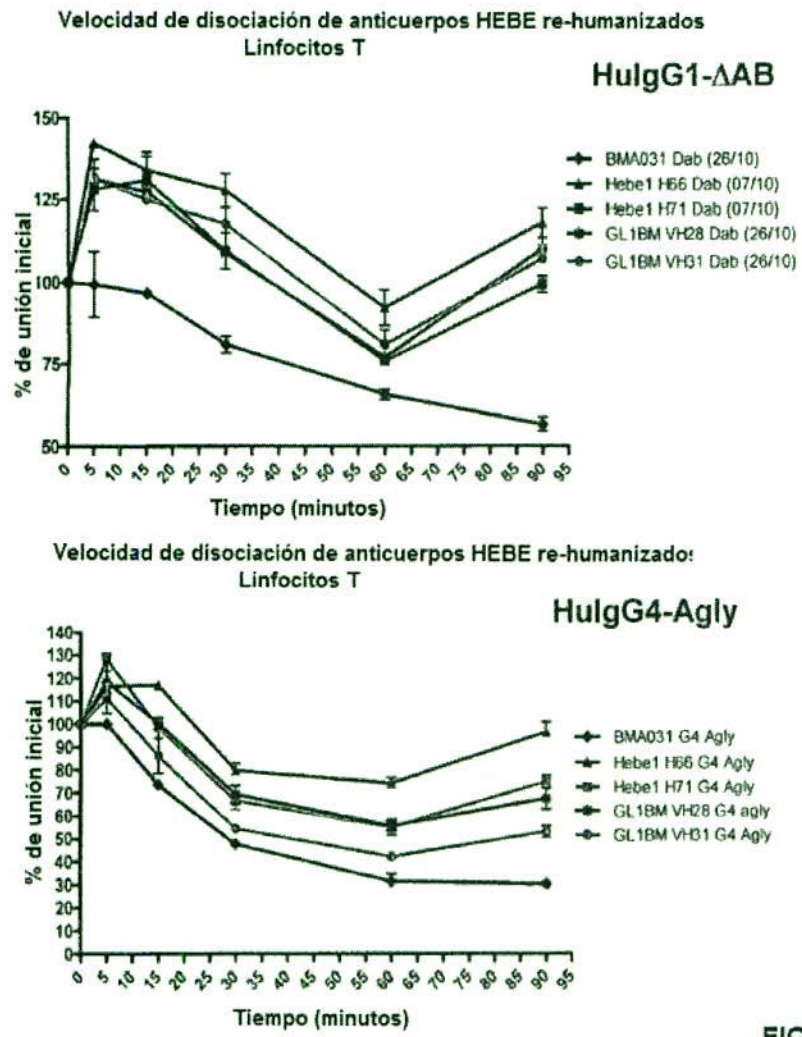


FIGURA 8

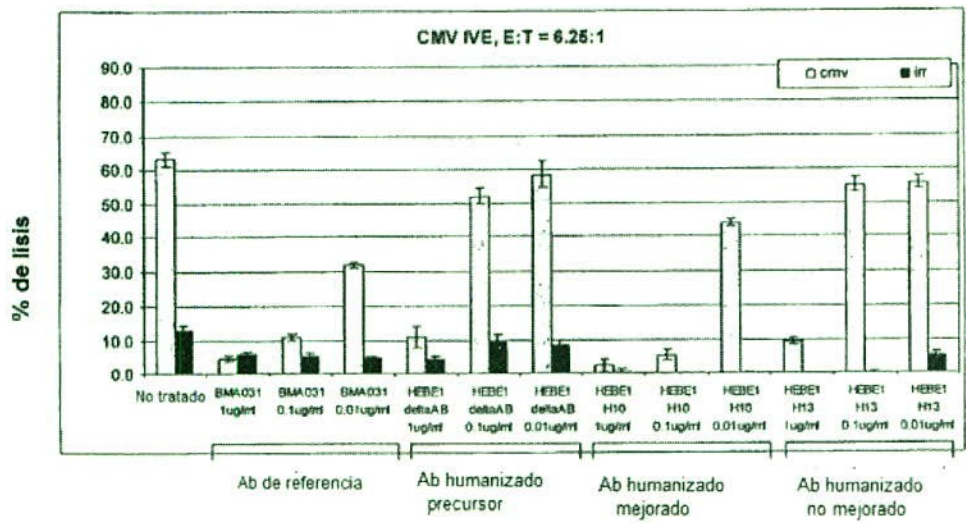


FIGURA 9

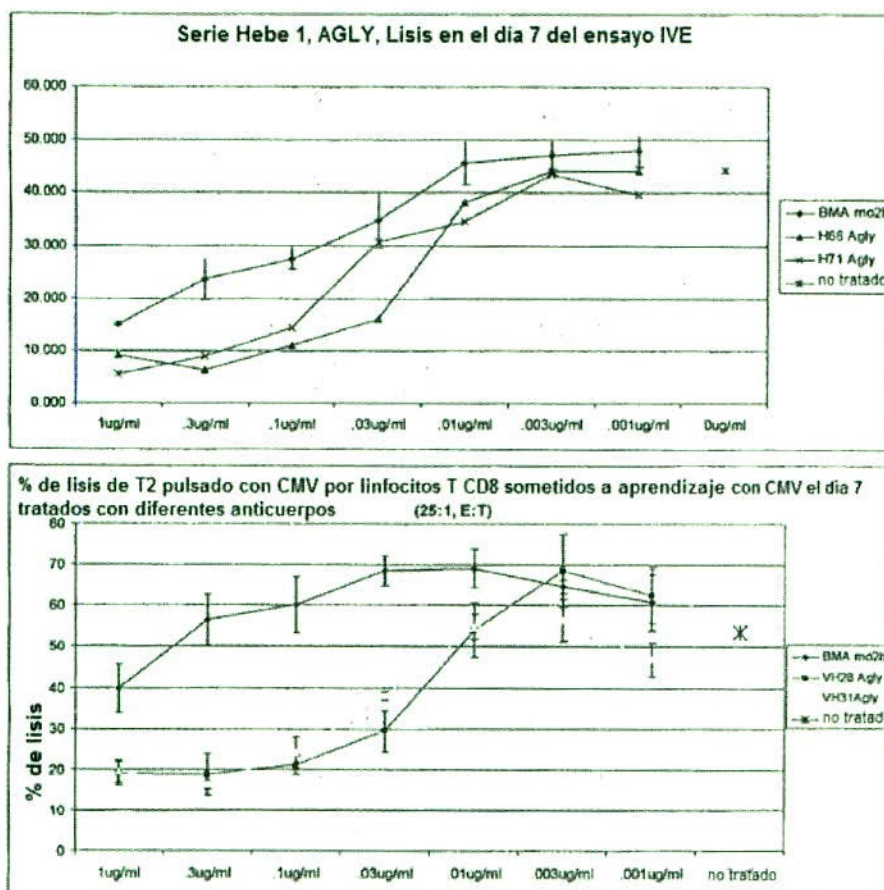


FIGURA 10

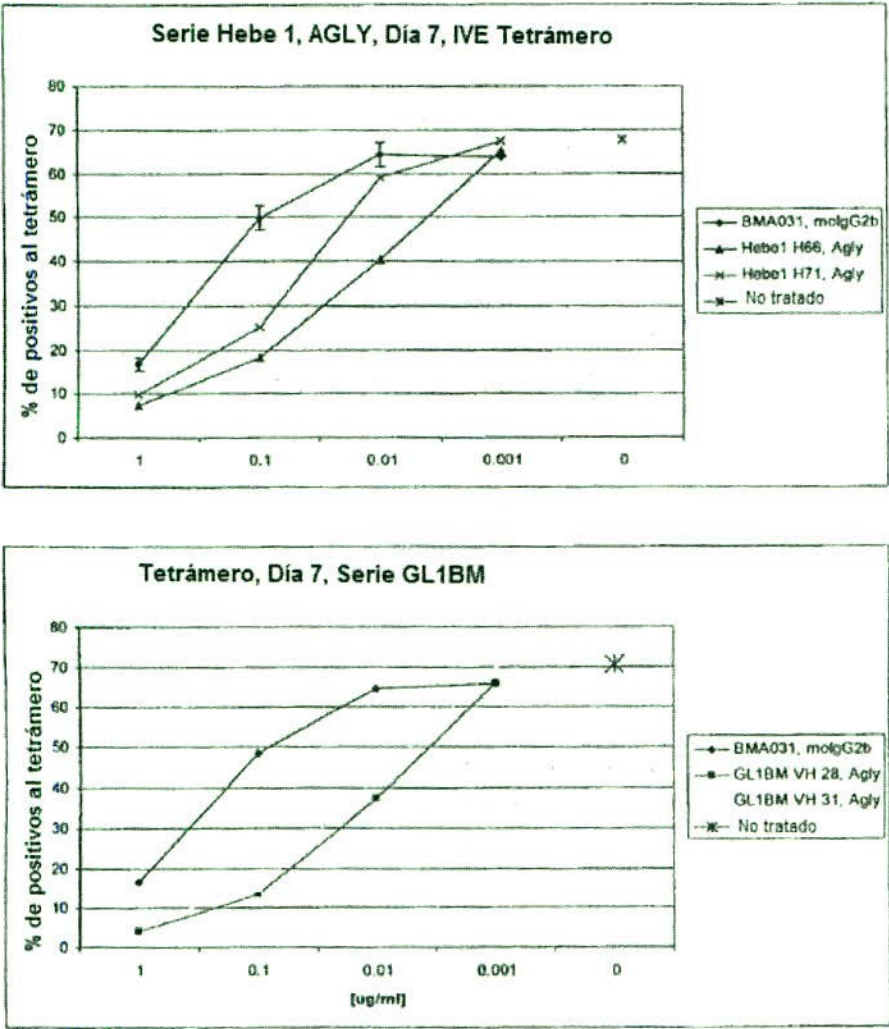


FIGURA 11

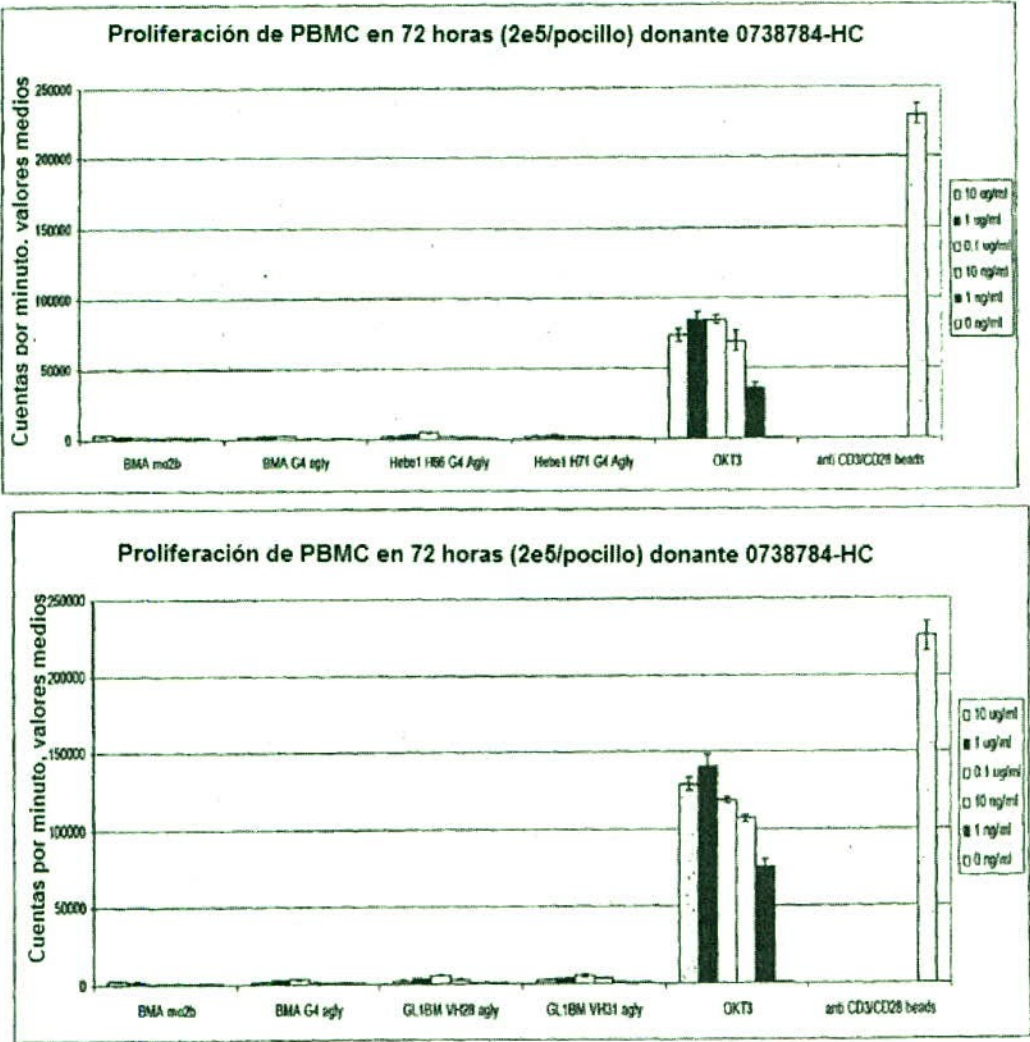


FIGURA 12

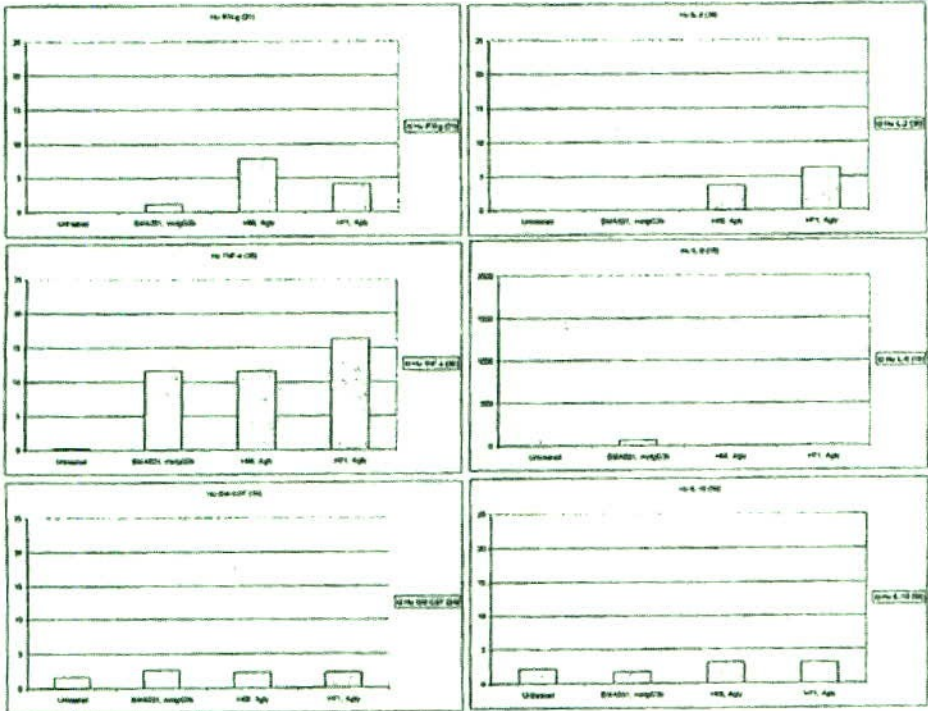


FIGURA 13

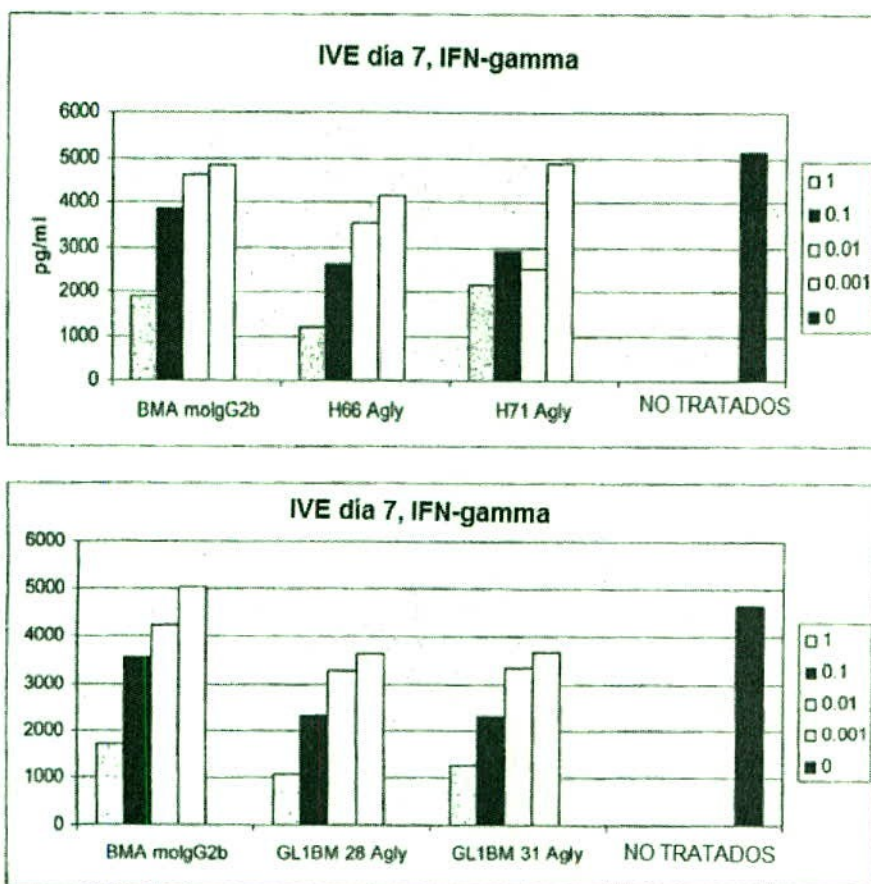


FIGURA 14

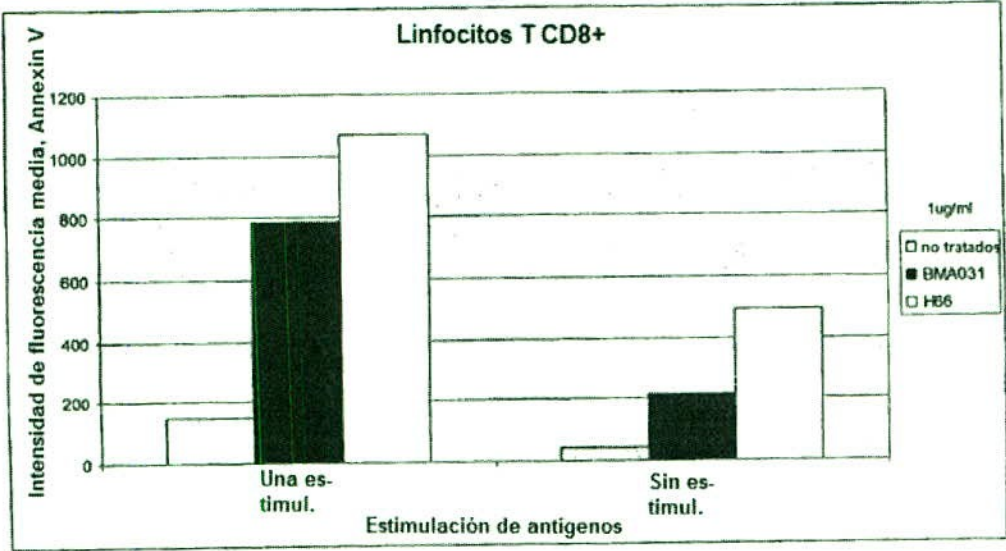


FIGURA 15

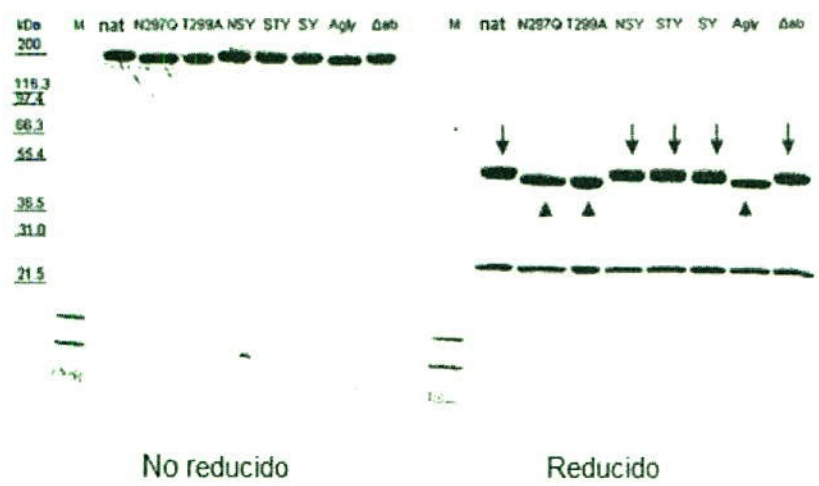
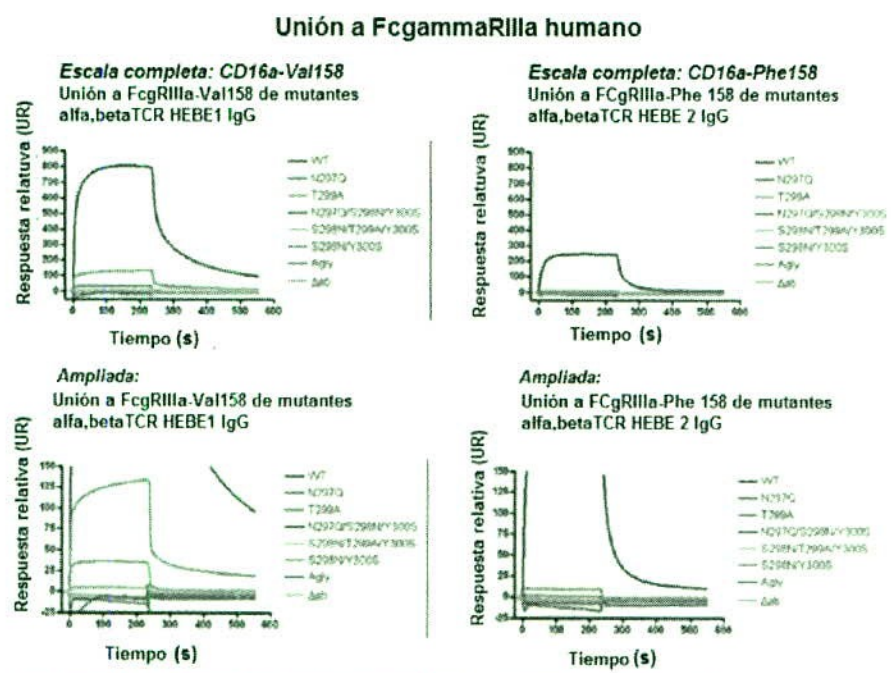


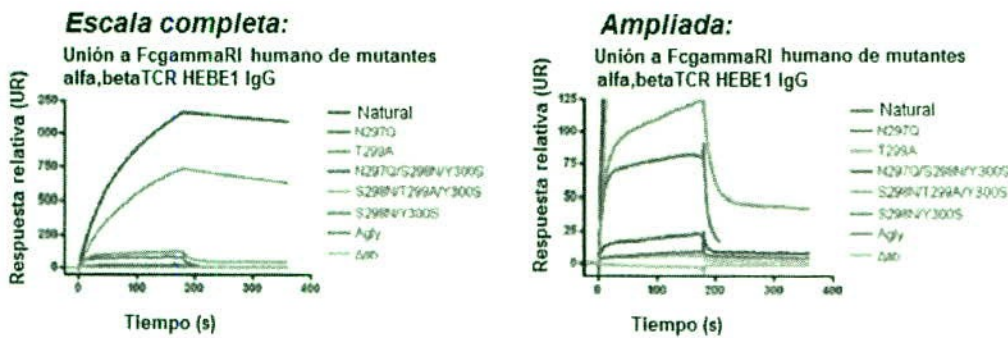
FIGURA 16



Muy poca unión a FcγRIIIa por los mutantes H66 S298N/T299A/Y300S en particular

FIGURA 17

Unión a FcgammaRI humano



Muy poca unión a FcgammaRI por los mutantes H66 S298N/T299A/Y300S en particular

FIGURA 18

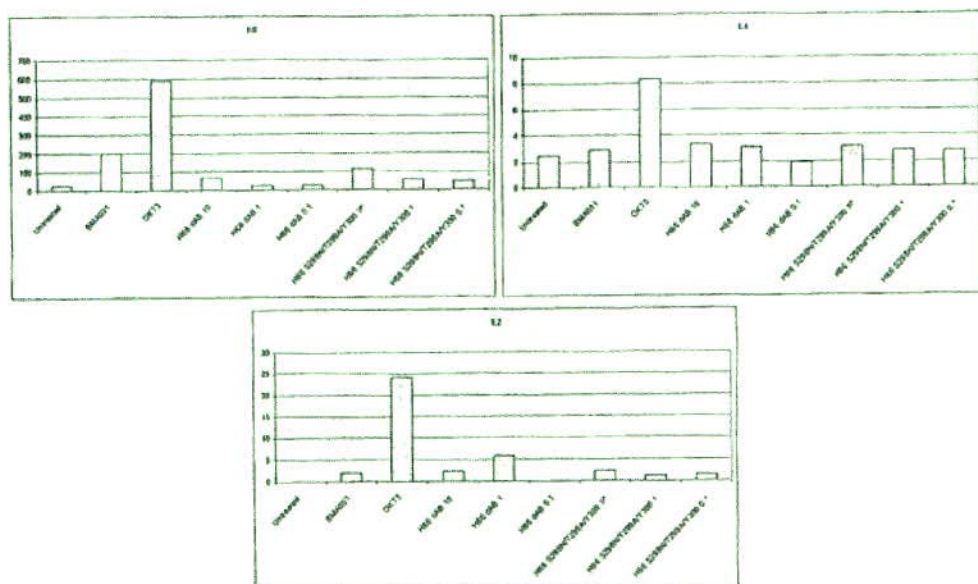
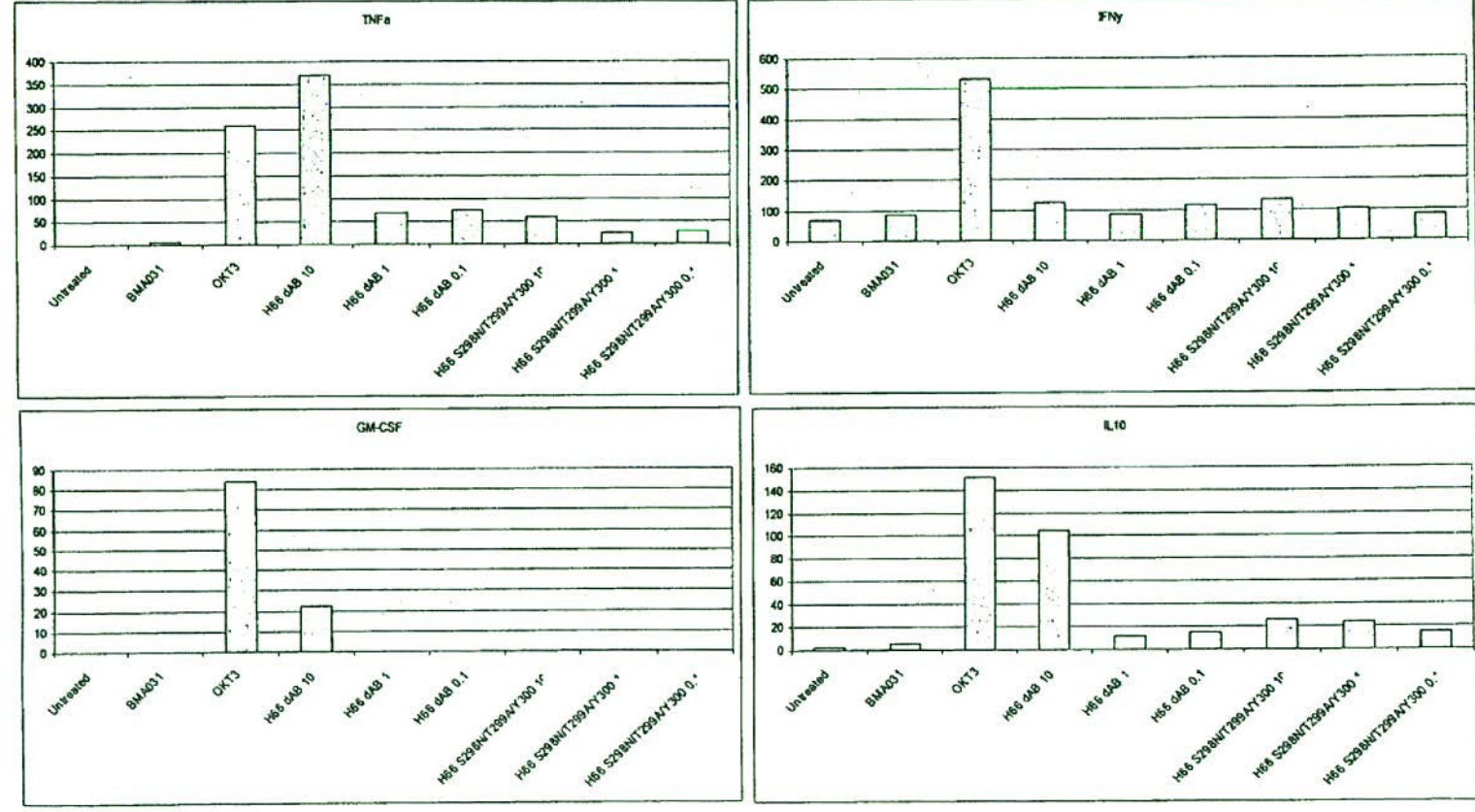


FIGURA 20

Figura 21



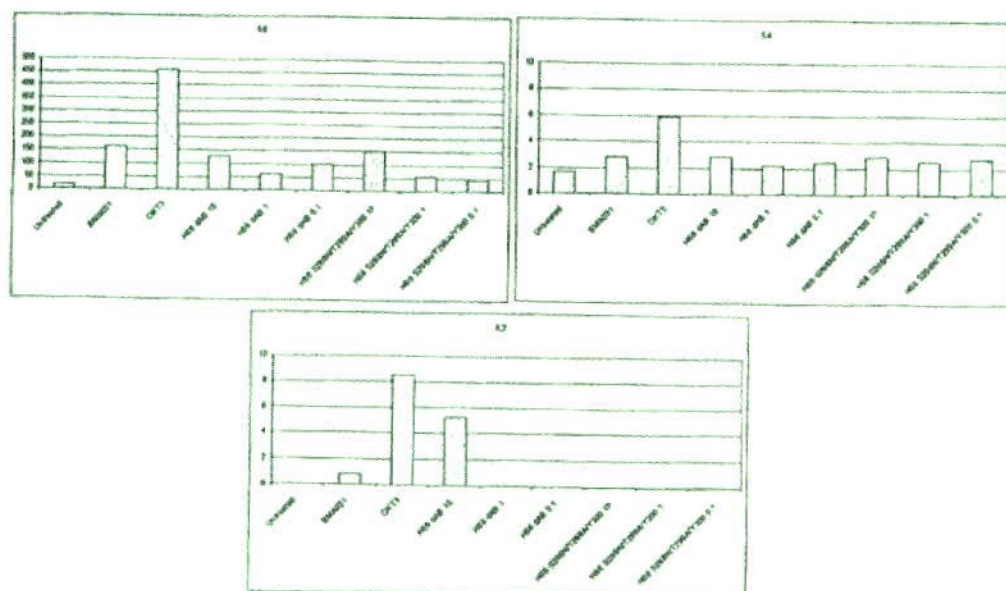
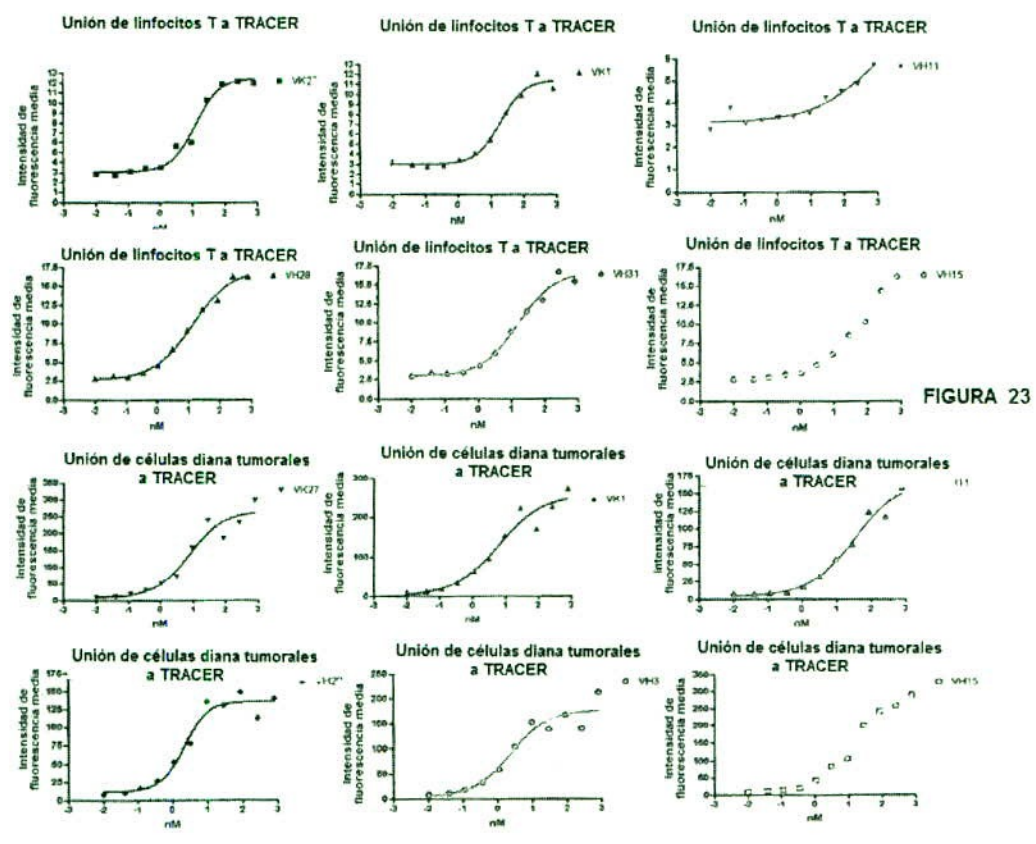


FIGURA 22



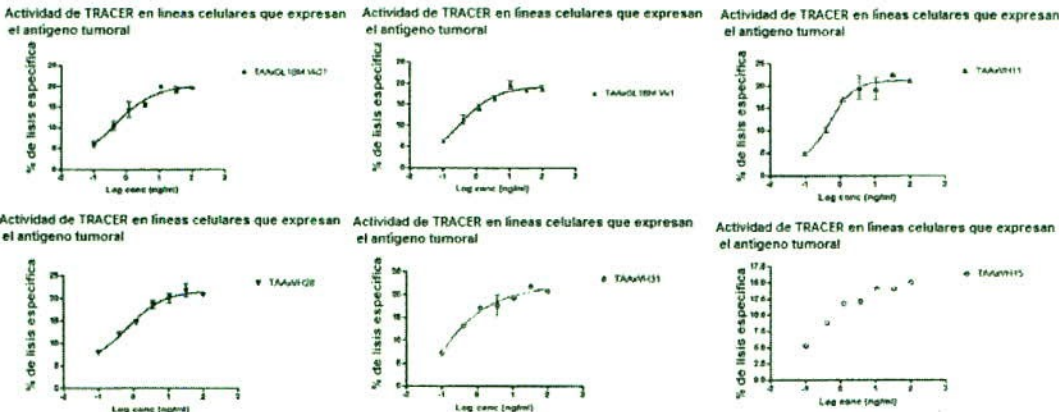


FIGURA 24

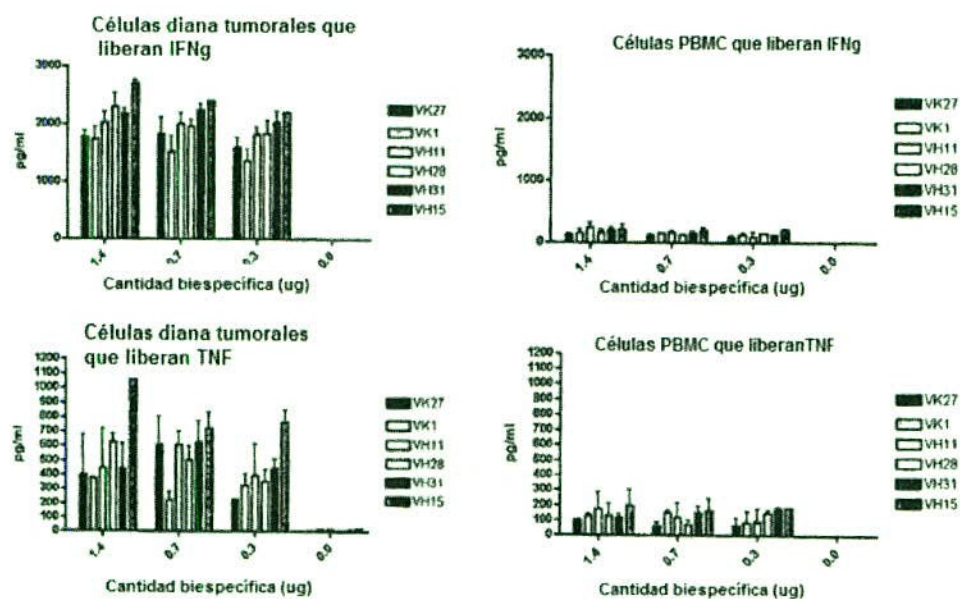


FIGURA 25

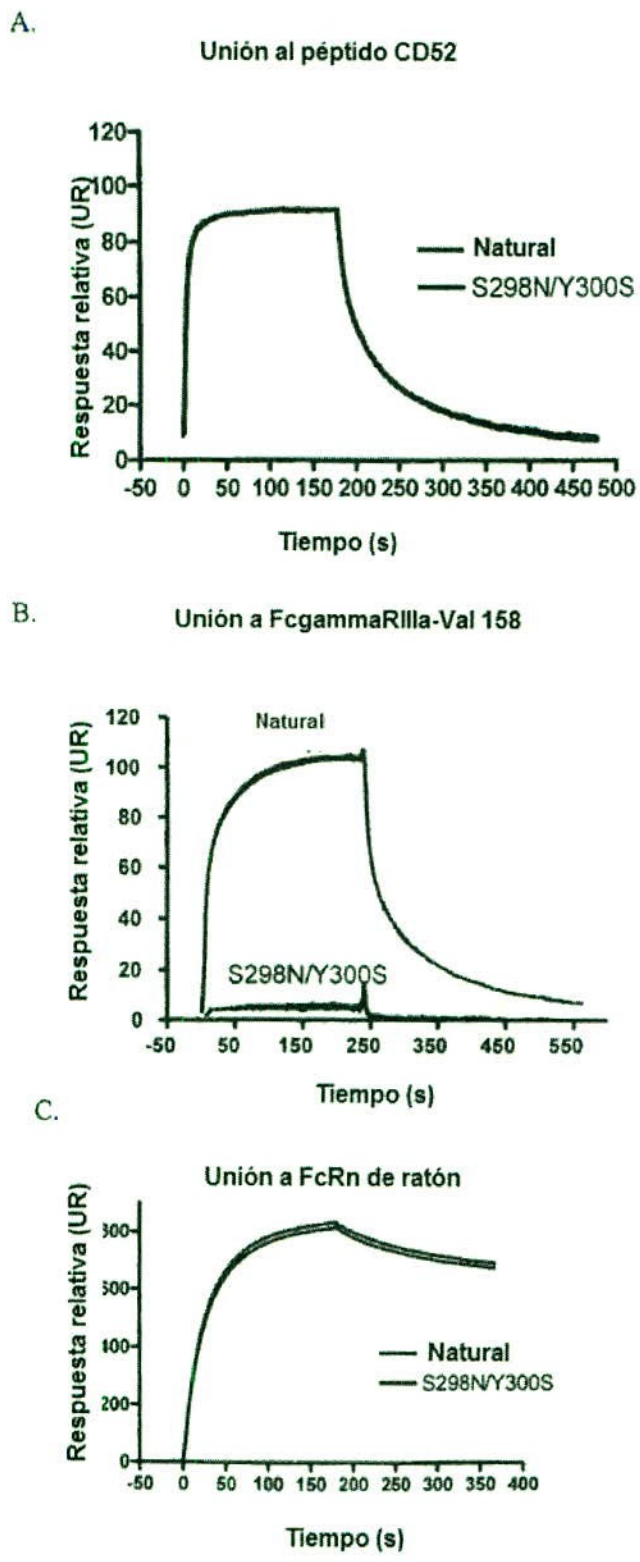


FIGURA 26

Listado de secuencias
SEQUENCE LISTING

<110> Genzyme Corporation
 SNELL, Daniel
 MENRAD, Andreas
 LaCORCIA, Gina
 SHANKARA, Srinivas
 QIU, Huawei
 PAN, Clark

<120> Anti-Alpha Beta TCR Antibodies

<130> AM/JS/300232.20772WO

<150> US 61/533,510
 <151> 2011-09-12

<160> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys

Página 1

Listado de secuencias
90

85

90

95

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu val Thr val Ser Ala
115 120

```
<210> 2
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus
```

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210>	3
<211>	120
<212>	PRT

Listado de secuencias

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: EuCIV3 Heavy chain variable domain

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: EuCIV3 Light chain variable domain

<400> 4

Listado de secuencias

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

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: HEBE1 Heavy chain variable domain

<400> 5

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

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

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

Listado de secuencias

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: HEBE1 Light chain variable domain

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Listado de secuencias

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

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

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: HEBE1 H10 Heavy chain variable domain

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 Listado de secuencias
120

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic sequence: GL1BM Heavy chain variable domain

<400> 8

Gln val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser val Lys val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu val Thr val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial sequence

Listado de secuencias

<220>

<223> Synthetic sequence: GL1BM Light chain variable domain

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

Listado de secuencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

Listado de secuencias

225	230	235	240
Thr Lys Asn Gln Val	Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro	
	245	250	255
Ser Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn	
	260	265	270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
	275	280	285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
	290	295	300
Phe Ser Cys Ser Val	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
305	310	315	320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325		

<210> 11
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic sequence: HuIgG4 agly Fc

<400> 11

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

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

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

Listado de secuencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
Página 11

Listado de secuencias

245

250

255

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: HEBE1 H66 Heavy chain variable domain

<400> 12

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Listado de secuencias

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: HEBE1 H71 Heavy chain variable domain

<400> 13

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Listado de secuencias

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: GL1BM VK43 Light chain variable domain

<400> 14

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 15

<211> 120

Listado de secuencias

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: GL1BM VH28 Heavy chain variable domain

<400> 15

Gln val Gln Leu val Gln Ser Gly Ala Glu val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser val Lys val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

val Met His Trp val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu val Thr val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: GL1BM VH31 Heavy chain variable domain

<400> 16

Listado de secuencias

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Página 16

Listado de secuencias

35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys

<210> 18
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

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

Listado de secuencias

Ala Arg

<210> 19
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

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

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

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

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

<210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic sequence: GL1BM VHdelta5

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Listado de secuencias

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: GL1BM VK1

<400> 21

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

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

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

Listado de secuencias

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

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

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

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

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic sequence: GL1BM VK27

<400> 22

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

Listado de secuencias

85

90

95

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

<210> 23

$\langle 210 \rangle$	25
$\langle 211 \rangle$	120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

<223> Synthetic sequence: GL1BM VHdeltaS VH11

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

Listado de secuencias

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Synthetic sequence: GL1BM VHdeltaS VH15

 <400> 24

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

 Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 106917

Bogotá D.C., Septiembre 30 de 2015 - 15:07:11

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	708600782	29/09/2015	2.706.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
			\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-075370- -00004-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 92

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-232125- -00000-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 30 de 2015 - 15:07:12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 106918

Bogotá D.C., Septiembre 30 de 2015 - 15:07:11

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	708600782	29/09/2015	2.706.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
18 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	576.000.00
				\$576.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y SEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-075370-00004-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 92

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-232125-00000-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 30 de 2015 - 15:07:12



No. 15-232125-00000-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 92



No. 14-075370-00004-0000

Fecha: 2015-09-30 15:20:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
 Act. 851 DIVISIONAL Folios: 92

LISTA DE CHEQUEO
 ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐PATENTE DE INVENCION PCT ☐MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐