

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

ANTICUERPO ANTI-ALFA BETA TCR

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:

GENZYME
CORPORATION

**Dirección
Electrónica:**

sic@castellanosyco.co

Dirección:

500 KENDALL STREET,
CAMBRIDGE,
MASSACHUSETTS
02142, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

**Domicilio/País de
constitución:**

ESTADOS UNIDOS DE
AMÉRICA -
MASSACHUSETTS -
CAMBRIDGE

Identificación:

☐ CEDULA DE
CIUDADANIA

☐ CEDULA DE
EXTRANJERIA

☒ EMPRESA
EXTRANJERA

☐ NIT

☐ PASAPORTE

Número: 2213541324-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. GENZYME CORPORATION

EE

2213541324

4 Datos del Inventor

Nombre:	DANIEL SNELL	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	89 Tennyson Place, Ely, CB6 3WF, GRAN BRETAÑA	Domicilio/País de constitución:	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA - INGLATERRA - CAMBRIDGE
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE ☒ No Aplica Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1. SNELL DANIEL		REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	
2. MENRAD ANDREAS		REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	
3. LACORCIA GINA		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
4. SHANKARA SRINIVAS		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
5. QIU HUAWEI		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
6. PAN CLARK		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
7. KEBBLE BENJAMIN		SUIZA	
6	Datos Inventor(es)		
País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1. REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	INGLATERRA	CAMBRIDGE	89 Tennyson Place, Ely, CB6 3WF, GRAN BRETAÑA

2.	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	INGLATERRA	CAMBRIDGE	3 Twenty Pence Road, Wilburton, Ely CB6 3RN, GRAN BRETAÑA
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MASSACHUSETTS	CONCORD	442 Fitchburg Turnpike, Concord, MA 01742, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MASSACHUSETTS	SHREWSBURY	17 Sheryl Dr, Shrewsbury, MA 01545, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MASSACHUSETTS	WESTBOROUGH	5 Primrose Lane, Westborough, MA 01581, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MASSACHUSETTS	SUDBURY	353 Dutton Road, Sudbury, MA 01776, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7.	SUIZA	ZURICH	ZURICH	Freiestrasse 94, CH-8032, Zúrich, SUIZA
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		sic@castellanosyco.co	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:				
☒ CEDULA DE CIUDADANIA			☐ CEDULA DE EXTRANJERIA	
☐ EMPRESA EXTRANJERA			☐ NIT	
☐ PASAPORTE				
Número:		39779654-		
Presentación de Poder				

Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/EP2012/003819	Fecha Solicitud:	12/09/2012
Número Publicacion:		WO 2013/037484 A2	Fecha Publicacion:	21/03/2013
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	Codigo del país US	(31) No. Solicitud 61/533,510	(32) Fecha 12/09/2011
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		28	Pago Reivindicaciones:	No
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☐ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☐ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos				

ANTICUERPO ANTI-αβTCR

La presente invención se refiere a un anticuerpo específico para el receptor de linfocitos T alfa beta (abreviadamente en lo sucesivo αβTCR por la expresión inglesa *αβ T cell receptor*). En particular, la invención se refiere a un anticuerpo anti-αβTCR humanizado, que se deriva del anticuerpo monoclonal BMA031 de murino, 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 antisueros policlonales contra los linfocitos es bien conocido para fines de inmunosupresión. Sin embargo, los antisueros tienen una producción laboriosa, muestran propiedades que varían de lote a lote y es limitada la especificidad que se puede obtener utilizando antisueros 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 antisueros policlonales, los anticuerpos monoclonales (mAb) son más específicos y tienen propiedades más consistentes. Los mAb han se han usado 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 una 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 multímeras 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

5 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

10 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

15 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

20 complementaridad (abreviadamente CDR por la expresión inglesa *complementarity determing 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

25 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

30 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

35 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 HulgG1 y EuCIV3 HulgG1. 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 HulgG1, HEBE1 HulgG1 y EuCIV3 HulgG1. 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.

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 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 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.

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.

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 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.

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.

15 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.

20 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.; 5 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 10 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- 15 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 20 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 25 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., 30 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.

35 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.

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 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 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 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 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 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 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 CH₂. 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 cadenas 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 poliovirus, virus de la gripe 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 poliovirus, el potenciador baculoviral o el locus IgG2a de murinos (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 β -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 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 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 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 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 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. 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 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) *Lett. 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 $\alpha\beta$ 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 incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos, tales como polioxietileno-oleil-éter y n-hexadecil-polietileno-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 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 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 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 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 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 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
5 otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material 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 morbosos 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 MolG2b-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 MolG2b-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
 5 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)
 10 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
 15 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.

20 **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
 25 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
 30 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)
 35 la expresión de CD25; o (iv) la liberación de citoquinas. En contraste, OKT3 si induce todos los efectos antes mencionados. MBA031 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 Fc γ RI 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

5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

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 intercambi6 con tamp6n en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0 utilizando una columna de desalinaci6n Zeba y se diluy6 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el tamp6n 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 despu6s de 20 minutos de inyecci6n a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Similar al experimento anterior, se captur6 diez veces m6s de Fc γ RI en la superficie de anti-Tetra-His para comparar los agentes de uni6n d6bil. El Fc γ RI humano recombinante se diluy6 hasta 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tamp6n de uni6n HBS-EP y se inyect6 en la celdilla de flujo 2 durante

10 de amina. Dos celdillas de flujo de un chip CM5 se inmovilizaron con ~9000 UR del anticuerpo anti-Tetra-His despu6s de 20 minutos de inyecci6n a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Similar al experimento anterior, se captur6 diez veces m6s de Fc γ RI en la superficie de anti-Tetra-His para comparar los agentes de uni6n d6bil. El Fc γ RI humano recombinante se diluy6 hasta 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tamp6n de uni6n HBS-EP y se inyect6 en la celdilla de flujo 2 durante

15 1 minuto a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ para capturar ~1000 UR del receptor en el chip anti-Tetra-His. Una concentraci6n 6nica de anticuerpo, 100 nM, se inyect6 durante 3 minutos a 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ en el receptor capturado y la superficie de control. La disociaci6n se monitoriz6 durante 3 minutos. La superficie se regener6 con dos inyecciones de 30 segundos de glicina 10 mM, pH 2,5, a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

20 Los resultados se muestran en la Figura 18.

El resultado sugiere muy poca uni6n de los mutantes glicomodificados por ingenier6a a Fc γ RIIIa o Fc γ RI. El H66 S298N/T299A/Y300S en particular tiene casi completamente abolida la uni6n a ambos receptores. Este mutante fue elegido como el principal para la caracterizaci6n detallada.

25 *Caracterizaci6n de la estabilidad utilizando dicro6ismo circular (abreviadamente CD por la expresi6n inglesa circular dichroism).*

La estabilidad del mutante del anticuerpo S298N/T299A/Y300S se monitoriz6 por un experimento de termofusi6n en un Far-UV CD, donde la se6al de CD a 216 nm y 222 nm se monitoriz6 a medida que aumentaba la temperatura que finalmente condujo al despliegue del anticuerpo. Los espectros de CD fueron recogidos en un espectrof6t6metro Jasco 815 a una concentraci6n de prote6nas de aproximadamente 0,5 mg/mL en un tamp6n 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 termoel6ctrico (Jasco modelo AWC100) y se elev6 a una velocidad de 1°C/min desde 25-89°C. Se recogieron

30 tanto la se6al 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 utiliz6 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, hulgG1 deltaAB 10 µg/mL, 1 µg/mL y 0,1 µg/mL

15 • H66, hulgG1 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, IFNγ, TNFα). 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 αβTCR. 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-αβTCR humanizadas:

GL1BMΔSxVK1

GL1BMΔSxVK27

GL1BMΔSVH11xVK1

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.
5
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.
10
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.
15
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.
20
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.
25
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.
30
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
35

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.



(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/003819

(22) International Filing Date:
12 September 2012 (12.09.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/533,510 12 September 2011 (12.09.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GENZYME CORPORATION** [US/US]; 15 Pleasant Street Connector, Framingham, MA 01701-9322 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SNELL, Daniel** [GB/GB]; 89 Tennyson Place, Ely, CB6 3WF (GB). **MENRAD, Andreas** [DE/GB]; 3 Twenty Pence Road, Wilburton, Ely, CB6 3RN (GB). **LACORCIA, Gina** [US/US]; 442 Fitchburg Turnpike, Concord, MA 01742 (US). **SHANKARA, Shrinivas** [US/US]; 17 Sheryl Dr, Shrewsbury, MA 01545 (US). **QIU, Huawei** [US/US]; 5 Primrose Lane, Westborough, MA 01581 (US). **PAN, Clark** [US/US]; 353 Dutton Road, Sudbury, MA 01776 (US).

(74) Agents: **MASCHIO, Antonio** et al.; MASCHIO & SOAMES LLP, 20 Carlton Crescent, Southampton, SO15 2ET (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ANTI-APLHABETATCR ANTIBODY

(57) Abstract: The present invention relates to humanized monoclonal antibodies comprising the CDRs of murine antibody BMA031, which bind to the apTCR.CD3 complex and possess improved biological properties.



WO 2013/037484 A2

Anti- $\alpha\beta$ TCR antibody

The present invention relates to an antibody specific for the alpha beta T cell receptor ($\alpha\beta$ TCR). In particular, the invention relates to a humanized anti- $\alpha\beta$ TCR antibody, which is derived from the murine monoclonal antibody BMA031, and the use of said humanized antibody in immunosuppressive therapy.

Introduction

The use of immunosuppressive agents in autoimmune diseases and organ transplant therapy is well documented; however the process is far from optimal. Toxicity, opportunistic infections, cytokine storm and increased risk of cancer are prevalent in patients treated with these agents. The use of biologics in this arena has improved patient outcome to some degree yet these side effects remain evident.

The use of polyclonal antisera against lymphocytes is well known for the purpose of immunosuppression. However, antisera are labor-intensive to produce, show properties which vary between batches, and the specificity which can be obtained using polyclonal antisera is limited.

Monoclonal antibody production by hybridoma technology was first described by Köhler and Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)). As compared to polyclonal antisera, monoclonal antibodies (mAbs) are more specific, and have more consistent properties. mAbs have been most frequently and successfully used for immunosuppressive therapy in clinical organ transplantation. However, most mAbs used as immunosuppressive agents for treating autoimmune diseases and in transplant patients have a broad immunosuppressive capacity, thus undesirably influencing functions of a wide spectrum of immune cells, presumably not all involved in graft rejection.

Mouse monoclonal antibodies against T cell surface receptor antigens were first produced in 1979 using hybridoma technology (Kung *et al.* (1979) *Science* 206:347-349). Of the three monoclonal antibodies discovered by Kung *et al.*, one antibody designated muromonab-CD3 (OKT3) had defined specificity to the CD3 receptor of the T cell, reacting with more than 95% of peripheral mature T cells without affecting immature thymocytes. Binding of OKT3 to the CD3 complex causes internalization of the CD3 receptor and loss of CD3 positive cells from the periphery. Successful OKT3 treatment is associated with a prompt decline in CD3 positive T cells from approximately 60% to less than 5%.

CONFIRMATION COPY

OKT3 has been extensively used for the treatment of patients undergoing acute allograft rejection after kidney transplantation (Russell, P.S., Colvin, R.B., Cosimi, A.B. (1984) *Annu. Rev. Med.* 35:63 and Cosimi, A.B., Burton, R.C., Colvin, R.B. *et al.* (1981) *Transplantation* 32:535). Moreover, OKT3 and rabbit complement were used for purging
5 mature T cells from donor marrow to prevent acute graft versus host disease (GVHD) in allogeneic bone marrow transplantation (Prentice, H.G., Blacklock, H.A., Janossy, G. *et al.* (1982) *Lancet* 1:700 and Blacklock, H.A., Prentice, H.G., Gilmore, M.J. *et al.* (1983) *Exp. Hematol.* 11:37). Whereas OKT3 treatment seems to be effective in the prevention of GVHD in allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia, a combined *in*
10 *vitro* *in vivo* treatment with OKT3 failed to prevent GVHD during therapy for severe combined immunodeficiency (Hayward, A.R. *et al.* (1982) *Clin. Lab. Observ.* 100:665). Treatment of T cells with OKT3 elicits several responses inconsistent with immune suppression including T cell activation, production of immune mediators and T3-modulation. The T3-antigen complex recognized by CD3-mAbs (*e.g.*, OKT3) is postulated
15 to play a crucial role during T cell activation. Alpha/beta T lymphocytes recognize peptide-MHC ligands by means of a multimeric protein ensemble termed the $\alpha\beta$ T cell antigen receptor (TCR)·CD3 complex. This structure is composed of a variable $\alpha\beta$ TCR dimer which binds antigens and three invariant dimers (CD3 $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ and $\zeta\zeta$) which are involved in TCR·CD3 surface transport, stabilization and signal transduction. The alpha beta T cell
20 receptor ($\alpha\beta$ TCR) is expressed on the majority (approx. 95%) of T cells and has a critical role in T cell activation via engagement of antigen displayed on MHC. The remaining 5% of cells are gamma delta T cell receptor ($\gamma\delta$ TCR) positive. The $\gamma\delta$ TCR positive cell population plays an important role in the innate immune response in defense against opportunistic infections of bacterial, viral and fungal origin. Gamma delta T cells do not
25 play a role in graft rejection in transplantation. Therefore, targeting the $\alpha\beta$ TCR positive cell population and sparing the $\gamma\delta$ TCR positive population should allow for significant therapeutic efficacy whilst maintaining a baseline immune protection against opportunistic infections.

The mouse IgG2b monoclonal antibody BMA031 (Borst *et al.* (Nov. 1990) *Hum. Immunol.* 29(3):175-88; EP0403156) is specific for the common determinant on the TCR
30 alpha/beta/CD3 complex, and does not bind to the gamma-delta TCR. BMA031 is highly immunosuppressive and is capable of inducing apoptosis of activated T cells via a mechanism of activation-induced cell death (AICD) (Wesselborg *et al.* (May 1993) *J. Immunol.* 150(10): 4338-4345). *In vitro* it inhibits a mixed lymphocyte reaction and it has
35 shown preliminary clinical efficacy in prevention of graft rejection in a number of solid

organ transplant scenarios as well as the treatment of acute graft versus host disease (aGVHD) (Kurrle *et al.* (Feb 1989) *Transplant Proc.* 21(1): 1017-1019). BMA031 does not engage human Fc gamma receptors (Fc γ R) in the majority of the human population (approximately 10% of human possess Fc γ Rs which do bind to mouse IgG2b isotype). As such the antibody does not cause T cell activation via cross-linking of the T cell receptor and, therefore, it does not induce T cell activation or the associated cytokine release. In this regard its profile is highly preferable over that of OKT3. However, BMA031 is a murine antibody and, as such, is not suitable for repeat dosing in human subjects in view of the human anti-mouse antibody (HAMA) response elicited therein.

Several humanized versions of BMA031 have been described (see, EP 0403156; *also* Shearman *et al.*, (1991) *J. Immunol.* 147:4366-4373). As noted in EP0403156, mere CDR grafting was not successful in retaining antigen binding. One clone with significant framework modifications, EUCIV3, successfully bound to T cells; however, as noted in EP0403156, binding to the $\alpha\beta$ TCR is not as effective as the parent BMA031 antibody as determined by flow cytometry competition assays. We have also shown that the ability of EuCIV3 to inhibit an *in vitro* immune response is significantly reduced as compared to BMA031 (see, Fig. 2). In addition EuCIV3 was originally generated on a wild-type human IgG1 or IgG4 backbone which still retains Fc γ R binding. These humanized antibodies therefore allowed for T cell activation, proliferation and the concomitant cytokine release and as such were significantly different to the original properties of BMA031.

The modification of antibody glycosylation is known in the art. For example, it is known that aglycosylated antibodies can have extensively modified functionality; see, Boyd *et al.* (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318. However, aglycosylated forms of humanized BMA031, or derivatives with modified glycosylation patterns, have previously not been described.

There is a need in the art, therefore, for an anti- $\alpha\beta$ TCR humanized antibody which improves on the binding properties of EUCIV3 and advantageously retains the immunosuppressive and non-T cell-activatory properties of BMA031.

Summary of the Invention

In a first aspect, there is provided a humanized monoclonal antibody which comprises the CDRs of BMA031, and retains the binding affinity of BMA031 for its cognate antigen. In a first embodiment, said humanized antibody comprises a heavy chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NOs: 7, 12 or 13 and the human IGH3-23

framework set forth in SEQ ID NO: 17, wherein framework position 6 is a donor residue; in an alternative embodiment, framework position 18 is a donor residue. Optionally, framework positions 49 and/or 69 are donor residues.

5 In a second embodiment, the humanized monoclonal antibody comprises a heavy chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NOs: 15 or 16 and the human IGHV1-3*01 framework set forth in SEQ ID NO: 18, wherein one or more of framework positions 38, 44 and/or 48 is a donor residue; in an alternative embodiment, framework positions 44 and 48 are donor residues.

10 In a third embodiment, the humanized monoclonal antibody comprises a light chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NO: 14 and the human IGKV3-11*01 framework set forth in SEQ ID NO: 19, wherein framework positions 70 and/or 71 are donor residues. Optionally, position 46 is a donor residue.

15 Examples of antibodies according to the first embodiment include antibodies which comprise a heavy chain variable region selected from the heavy chains comprising the sequences set forth in SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 and SEQ ID NO: 13, and a light chain variable region sequence comprising the sequence as set forth in SEQ ID NO: 14.

20 Examples of antibodies according to the second embodiment include antibodies which comprise a heavy chain variable region selected from the heavy chains comprising the sequences set forth in SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 16, and a light chain variable region comprising the sequence as set forth in SEQ ID NO: 14. The humanized antibodies according to the described embodiments are humanized versions of the BMA031. Their primary structures differ from that of the humanized antibody EuCIV3, which has decreased binding to the $\alpha\beta$ TCR as compared to BMA031.

25 In the sequence listing, CDRs are indicated by means of annotation or underlining. Frameworks are all sequences outside of the CDRs, which are defined according to the "Kabat" numbering system and extended, where applicable, by use of "IMGT" CDR definition. If a framework residue is not indicated to be changed to match a donor sequence, it will ordinarily be understood to be an acceptor residue.

30 The humanized antibodies may comprise a constant region. In one embodiment, the constant region is of human origin.

The humanized antibodies of the invention may be further modified by Fc engineering. Immunoglobulins are liable to cross-link Fc γ receptors, which can lead to constitutive T

cell activation for anti-T cell antibodies. In order to avoid Fc γ cross-linking, antibodies can be modified to remove the Fc region, such as by the generation of Fab or Fv fragments; however, truncated immunoglobulins lack beneficial effector functions and exhibit a lower serum half-life. Therefore, the Fc region of the humanized antibody can be modified to prevent Fc γ cross-linking. Exemplary techniques include generation of aglycosylated immunoglobulins, for instance by modification of the Fc region by an N297Q mutation. Immunoglobulins which fail to bind Fc γ are also described by Armour *et al.*, (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624. The modification effected to IgG1 is known as the Δ ab modification, and consists in a combination of the Δ a mutation, in which IgG residues are substituted at positions 327, 330 and 331, and IgG2 residues substituted at positions 233-236, and the Δ b mutation, in which residue 236 is deleted. In another embodiment, the glycosylation pattern of antibodies according to the invention can be modified.

In one embodiment, the antibody comprised one or more of mutations S298N, T299A and Y300S.

In embodiments, the antibody comprises two or more of mutations N297Q, S298N, T299A and Y300S. For example, there is provided a humanized antibody comprising the multiple mutations N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S or S298N/Y300S.

In a second aspect, there is provided a humanized monoclonal antibody which comprises the CDRs of BMA031, and retains the T cell suppression properties of BMA031. Said humanized antibody preferably comprises a heavy chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 12, 13, 15 or 16 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 14.

In a third aspect, there is provided a nucleic acid encoding at least a heavy chain variable region of a humanized monoclonal antibody according to the preceding aspects of the described embodiments. The nucleic acid may encode variable and constant regions of the humanized antibody. Heavy and light chains may be encoded on separate nucleic acids or on the same nucleic acid molecule.

According to a fourth aspect, there is provided a cell which expresses a nucleic acid according to the preceding aspect. The cell is, for example, a cell adapted to express antibody molecules in culture. The nucleic acid may include signal sequences and/or other sequences or modifications which are required for, or which modulate, expression of the antibody molecule in the cell, and/or secretion of the antibody molecule from the cell.

In a further embodiment, a humanized antibody is provided as described in the foregoing aspects, for use in suppressing a T cell mediated response in a subject.

For example, the T cell mediated response can be involved in a condition selected from tissue transplantation, including solid organ transplant and composite tissue transplant,
5 tissue grafting, multiple sclerosis and type 1 diabetes.

Moreover, another embodiment provides a method for treating a subject suffering from a condition involving an aberrant T cell mediated response comprising administering to a subject in need thereof a pharmaceutically effective dose of an antibody according to the described embodiments.

- 10 Humanized non-activatory anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies which do not induce cytokine release have thus been generated which are capable of selective modulation of the $\alpha\beta$ TCR and of inducing apoptosis of activated $\alpha\beta$ TCR positive T cells. These antibodies have been generated for use as immunosuppressive agents in T cell mediated diseases. These antibodies have been generated through humanization of a mouse anti- $\alpha\beta$ TCR antibody
15 BMA031 and by Fc-engineering of the humanized antibodies to prevent engagement of Fc gamma receptors. The antibodies according to the described embodiments retain the binding affinity of BMA031, unlike the humanized versions of BMA031 available in the art. Further, as shown in *in vitro* education assays, the immunosuppressive properties of antibodies according to the described embodiments are superior to those of BMA031.
20 Moreover, unlike the humanized BMA031 antibodies of the prior art, the antibodies according to the described embodiments do not induce cytokine release in normal PBMC.

In accordance with a fifth aspect, there is provided an antibody comprising a modified Fc, in which said modified Fc comprises a modified glycosylation pattern which reduces Fc γ R receptor binding, comprising one or more of mutations S298N, T299A and Y300S.

- 25 In one embodiment, the antibody comprises two or more of mutations N297Q, S298N, T299A and Y300S.

In embodiments, the antibody comprises the multiple mutations N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S or S298N/Y300S.

- For example, the antibody may be an antibody as described in preceding aspects of the
30 invention.

According to a sixth aspect, there is provided a multispecific antibody comprising at least a heavy chain of a first binding domain as described in the preceding aspects of the invention, and a second binding domain specific for a tumor-specific antigen.

In one embodiment, the first binding domain comprises a heavy chain according to the second aspect of the invention.

The multispecific antibody can comprise many different conformations; in one embodiment, it comprises an anti-TCR/CD3 scFv and an anti-tumor scFv.

In one embodiment, the multispecific antibody is bispecific.

10 Brief Description of the Figures

Fig. 1. BMA031 binds more strongly to $\alpha\beta$ TCR compared to EuCIV3.

Competition of binding of PE-labeled BMA031 antibody by BMA031 MolgG2b, BMA031 HulG1 and EuCIV3 HulG1 antibodies. EuCIV3 has a decreased potency compared to BMA031.

15 Fig. 2. EuCIV3 is less potent than BMA031 in an *in vitro* education (IVE) assay.

Plot showing loss of performance of EuCIV3 humanized antibody in biological assay when compared to parent BMA031 antibody. CD8⁺ T cells were treated with anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies at various concentrations (x-axis) and co-cultured with autologous dendritic cells pulsed with the CMV peptide 495-503 (pp65) for seven days.

20 Fig. 3. HEBE1 binds $\alpha\beta$ TCR comparably to BMA031 in a competition assay.

Competition of binding of PE-labeled BMA031 antibody by BMA031 HulG1, HEBE1 HulG1 and EuCIV3 HulG1 antibodies. EuCIV3 has a decreased potency compared to BMA031 and HEBE1.

Fig. 4. HEBE1 has similar potency to EuCIV3 in an *in vitro* education (IVE) assay.

25 The IVE assay was performed as described in respect of Fig. 2.

Fig. 5. Schematic showing iterative rounds of mutagenesis of anti- $\alpha\beta$ TCR variable domains.

Framework in shaded box depicts the FR region where certain mouse residues lie. Shaded residues in first row of mutations are the mouse amino acids that are useful to maintain off-rate. Shaded residues in second row of mutations are the mouse residues surrounding the CDR regions which were retained during the final germlining process.

Fig. 6. Optimized humanized antibody has improved off-rate compared to BMA031.

The kinetics of antibody dissociation from $\alpha\beta$ TCR on T cells was measured by flow cytometry. BMA031 had a better off-rate compared to EuCIV3 and HEBE1. By optimizing the binding domain of HEBE1 we were able to improve the off-rate of HEBE1.H10 compared to BMA031.

Fig. 7. Optimized humanized antibody has improved off-rate compared to BMA031.

The kinetics of antibody dissociation from $\alpha\beta$ TCR on T cells was measured by flow cytometry. By optimizing the binding domain of HEBE1 we were able to improve the off-rate of HEBE1.H66 compared to BMA031.

Fig. 8. Optimized humanized antibody has improved off-rate compared to BMA031 in both Δ ab and aglycosylated formats.

The kinetics of antibody dissociation from $\alpha\beta$ TCR on T cells was measured by flow cytometry.

Fig. 9. Optimization of HEBE1 leads to equivalent functionality as BMA031.

IVE assay as described in Fig. 4. BMA031 inhibited education of CD8+ T cells, as they were unable to lyse specific targets in a dose dependent manner. The parental humanized antibody, HEBE1, was not as potent as BMA031 and was able to only inhibit education at the highest dose (similar results observed with a second non-improved humanized Ab, HEBE1 H13). Further improvements were made to the humanized antibody, HEBE1 H10, which had equivalent potency to BMA031 in this assay.

Fig. 10. IVE data with anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies.

Both HEBE1 and GL1 BM series antibodies showed improvements in IVE results in comparison with BMA031.

Fig. 11. Antigen positive cells from IVE assay as determined by antigen-specific tetramer binding.

Cells which are antigen-positive (*i.e.*, have been educated within IVE assay) are able to bind to an MHC-tetramer molecule. When the IVE assay was conducted in the presence of antibody which has been able to prevent the education of T cells to antigen, there were fewer cells able to bind to the MHC-tetramer at the end of the assay.

Fig. 12. Proliferation of PBMCs in presence of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies, OKT3 and stimulatory beads.

The stimulatory activity of OKT3 was not seen in anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies in this comparison.

Fig. 13. Cytokine release from PBMCs in presence of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies.

Cytokine release profile of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies was similar to the profile demonstrated by BMA031.

Fig. 14. IFN-gamma release from T cells in IVE assay.

CD8⁺ T cells were treated with anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies at various concentrations (see Fig. 2, x-axis) and co-cultured with autologous dendritic cells pulsed with the CMV peptide 495-503 (pp65) for seven days in an in vitro education (IVE) assay. IFN-gamma release was measured in this assay.

Fig. 15. Activation-induced apoptosis by anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies.

Antigen stimulated CD8⁺ T cells were induced to apoptosis by binding of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies BMA031 and HEBE1 H66. The ability of HEBE1 H66 to induce apoptosis was increased compared to BMA031.

Fig. 16. Isolation of glycosylation mutants and aglycosylated antibodies

Coomassie-blue stained gel showing expression and purification of glycosylation mutants

Fig. 17. Binding of $\alpha\beta$ TCR antibody mutants to human Fc γ R11a using Biacore.

Biacore was used to assess binding to recombinant human Fc γ R11a (V158 & F158).

Fig 18. Binding of $\alpha\beta$ TCR antibody mutants to human Fc γ RI using Biacore.

Biacore was used to assess binding to recombinant human and FcγRI.

Fig. 19. Cytokine release from PBMCs in presence of glycosylation mutant anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies (day 2).

5 Cytokine release profile for TNFa, GM-CSF, IFN γ and IL10 of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies was similar to the profile demonstrated by BMA031 and H66 delta AB.

Fig. 20. Cytokine release from PBMCs in presence of glycosylation mutant anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies (day 2).

Cytokine release profile for IL6, IL4 and IL2 of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies was similar to the profile demonstrated by BMA031 and H66 delta AB.

10 **Fig. 21. Cytokine release from PBMCs in presence of glycosylation mutant anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies (day 4).**

Cytokine release profile for TNFa, GM-CSF, IFN γ and IL10 of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies was similar to the profile demonstrated by BMA031 and H66 delta AB.

15 **Fig. 22. Cytokine release from PBMCs in presence of glycosylation mutant anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies (day 4).**

Cytokine release profile for IL6, IL4 and IL2 of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies was similar to the profile demonstrated by BMA031 and H66 delta AB.

Fig. 23: Binding profiles of TRACERS.

20 Binding profiles of bi-specific antibodies to both tumor target cells and human T cells assessed by flow cytometry.

Fig. 24: Cytotoxic activity of different T cell recruitment arms.

A panel of humanised BMA031 antibodies have been created and from this panel a number of antibodies have been selected which display cytotoxic activity against tumor antigen expressing cell lines

25 **Fig. 25: Cytokine release profile of different T cell recruitment arms.**

A panel of TRACERs with different T cell recruitment arms show similar cytokine release profiles. Large amounts of cytokines are detected following activation of T cells in the

presence of target cells whereas in the presence of only unstimulated human PBMC observed cytokine levels are significantly lower.

Fig. 26: Binding of CD52 antibody mutants to human FcγRIIIa using Biacore.

Biacore was used to assess binding of modified anti-CD52 to recombinant human FcγRIIIa (V158). Anti-CD52 comprising S298N/Y300S mutations in the Fc domain were used to assess the effector function of the modified molecule. A: binding to CD52 peptide. B: binding to FcγRIIIa (V158). C: control binding to mouse FcRn.

Detailed Description of the Invention

Unless otherwise stated, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the methods or techniques of the present invention. All publications cited herein are incorporated herein by reference in their entirety for the purpose of describing and disclosing the methodologies, reagents, and tools reported in the publications that might be used in connection with the invention.

The methods and techniques of the present application are generally performed according to conventional methods well known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification unless otherwise indicated. See, e.g., 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.

A humanized monoclonal antibody, as referred to herein, is an antibody which is composed of a human antibody framework, into which have been grafted complementarity

determining regions (CDRs) from a non-human antibody. Changes in the human acceptor framework may also be made. Procedures for the design and production of humanized antibodies are well known in the art, and have been described, for example, in Cabilly *et al.*, U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.*, European Patent Application 0 125 023; 5 Boss *et al.*, U.S. Patent No. 4,816,397; Boss *et al.*, European Patent Application 0 120 694; Neuberger, M.S. *et al.*, WO 86/01533; Neuberger, M.S. *et al.*, European Patent Application 0 194 276 B1; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539; Winter, European Patent Application 0 239 400; Padlan, E.A. *et al.*, European Patent Application 0 519 596. Further details on antibodies, humanized antibodies, human engineered antibodies, and methods 10 for their preparation can be found in Kontermann, R. and Dübel, S. eds. (2001, 2010) *Antibody Engineering*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY.

The term "antibody", unless indicated otherwise, is used to refer to entire antibodies as well as antigen-binding fragments of such antibodies. For example, the term encompasses four-chain IgG molecules, as well as antibody fragments.

15 As used herein, the term "antibody fragments" refers to portions of an intact full-length antibody, for example, as further described below.

Antibodies may be of any class, such as IgG, IgA or IgM; and of any subclass, such as IgG1 or IgG4. Different classes and subclasses of immunoglobulin have different properties, which may be advantageous in different applications. For example, IgG4 20 antibodies have reduced binding to Fc receptors.

Specificity, in the context of the antibodies described herein, means that the claimed antibody be capable of selectively binding its defined cognate antigen, which is the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex. The antibodies of the invention bind the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex expressed on cells.

25 The human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex is the T cell receptor complex presented on the surface of T cells. See, Kuhns *et al.*, (2006) *Immunity* 24:133–139. This complex is targeted by the murine monoclonal antibody BMA031 (see, European patent application EP 0 403 156; SEQ ID NOs: 1 and 2).

Naturally occurring immunoglobulins have a common core structure in which two identical 30 light chains (about 24 kD) and two identical heavy chains (about 55 or 70 kD) form a tetramer. The amino-terminal portion of each chain is known as the variable (V) region and can be distinguished from the more conserved constant (C) regions of the remainder of each chain. Within the variable region of the light chain (also called the V_L domain) is a

C-terminal portion known as the J region. Within the variable region of the heavy chain (also called the V_H domain), there is a D region in addition to the J region. Most of the amino acid sequence variation in immunoglobulins is confined to three separate locations in the V regions known as hypervariable regions or complementarity determining regions (CDRs) which are directly involved in antigen binding. Proceeding from the amino-terminus, these regions are designated CDR1, CDR2 and CDR3, respectively. The CDRs are held in place by more conserved framework regions (FRs). Proceeding from the amino-terminus, these regions are designated FR1, FR2, FR3 and FR4, respectively. The locations of CDR and FR regions and a numbering system have been defined by 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), and updates thereof which may be found online). In addition, CDR region boundaries have been further defined by IMGT nomenclature.

Variable regions of antibodies according to the described embodiments may be found in SEQ ID NOs: 5-7 and 12-16, and may be obtained by humanizing BMA031, that is, by transferring the CDRs of BMA031 to a human framework. Two series of humanized antibodies are described; the HEBE1 series, comprising SEQ ID NOs: 5-7, 12 and 13, and the GL1BM series, comprising heavy chain variable regions as shown in SEQ ID NOs: 8, 15 and 16. In both cases, the light chain variable region used is as shown in SEQ ID NO: 14 (GL1BM VK43).

The human frameworks used are IGH3-23 in the case of HEBE1, and IGHV1-3*01 and IGKV3-11*01 in the case of GL1BM.

Constant regions may be derived from any human antibody constant regions. Variable region genes may be cloned into expression vectors in frame with constant region genes to express heavy and light immunoglobulin chains. Such expression vectors can be transfected into antibody producing host cells for antibody synthesis.

Human antibody variable and constant regions may be derived from sequence databases. For example, immunoglobulin sequences are available in the IMGT/LIGM database (Giudicelli *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res.* 34 (suppl. 1):D781-D784) or VBase (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

Aglycosylated antibodies can have extensively modified functionality; see, Boyd *et al.* (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318. A "delta ab" or Δ ab modification, referred to herein, is an Fc modification as described in Armour *et al.*, (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624. Techniques for modifying glycosylation of antibody Fc regions are known in the art, and include chemical, enzymatic and mutational means, for example, mutation of the N297

position in the CH₂ domain. Techniques for mutating antibody genes for producing aglycosylated IgG molecules are described in Tao and Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595-2601.

"Nucleic acids" as referred to herein include DNA molecules which encode the antibodies of the invention. Preferred are expression vectors, which are suitable for expressing the antibody genes in a host cell. Expression vectors and host cells for antibody gene expression are known in the art; see, for example, Morrow, K.J. *Genetic Engineering & Biotechnology News* (June 15, 2008) 28(12), and Backliwal, G. *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.* 36(15):e96-e96.

1. Antibodies

The invention encompasses antigen-binding fragments of the humanized anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies. Fragments of the antibodies are capable of binding the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex. They encompass Fab, Fab', F(ab')₂, and F(v) fragments, or the individual light or heavy chain variable regions or portion thereof. Fragments include, for example, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv and scFv. These fragments lack the Fc portion of an intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and can have less non-specific tissue binding than an intact antibody. These fragments can be produced from intact antibodies using well known methods, for example by proteolytic cleavage with enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')₂ fragments).

The antibodies and fragments also encompass single-chain antibody fragments (scFv) that bind to the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex. An scFv comprises an antibody heavy chain variable region (V_H) operably linked to an antibody light chain variable region (V_L) wherein the heavy chain variable region and the light chain variable region, together or individually, form a binding site that binds $\alpha\beta$ TCR. An scFv may comprise a V_H region at the amino-terminal end and a V_L region at the carboxy-terminal end. Alternatively, scFv may comprise a V_L region at the amino-terminal end and a V_H region at the carboxy-terminal end. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv)). An scFv may optionally further comprise a polypeptide linker between the heavy chain variable region and the light chain variable region.

The antibodies and fragments also encompass domain antibody (dAb) fragments as

described in Ward, E.S. *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546 which consist of a V_H domain.

The antibodies and fragments also encompass heavy chain antibodies (HCAb). These antibodies are reported to form antigen-binding regions using only heavy chain variable region, in that these functional antibodies are dimers of heavy chains only (referred to as "heavy-chain antibodies" or "HCAbs"). Accordingly, antibodies and fragments may be heavy chain antibodies (HCAb) that specifically bind to the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex.

The antibodies and fragments also encompass antibodies that are SMIPs or binding domain immunoglobulin fusion proteins specific for $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex. These constructs are single-chain polypeptides comprising antigen-binding domains fused to immunoglobulin domains necessary to carry out antibody effector functions (see, WO 2005/017148).

The antibodies and fragments also encompass diabodies. These are bivalent antibodies in which V_H and V_L domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain. This forces the domains to pair with complementary domains of another chain and thereby creates two antigen-binding sites (see, for example, WO 93/11161). Diabodies can be bispecific or monospecific.

The antibody or antibody fragment thereof does not cross-react with any target other than the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex.

The antibody or fragment thereof may be modified in order to increase its serum half-life, for example, by adding molecules - such as PEG or other water soluble polymers, including polysaccharide polymers to increase the half-life.

The antibodies and fragments thereof may be bispecific. For example, bispecific antibodies may resemble single antibodies (or antibody fragments) but have two different antigen binding sites (variable regions). Bispecific antibodies can be produced by various methods - such as chemical techniques, "polydoma" techniques or recombinant DNA techniques. Bispecific antibodies may have binding specificities for at least two different epitopes, at least one of which is the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex. The other specificity may be selected from any useful or desired specificities including, for example, specificity for human serum albumin for the extension of half-life *in vivo*.

The use of bi-specific antibodies in the clinic for oncology applications is now becoming reality with the tri-functional Catumaxomab (Removmab®) approved for use in cases of malignant ascites and the bi-specific antibody Blinatumomab now in phase II trials in hematological malignancies. These molecules have in common a binding arm which binds

to T cells and a second arm which binds to the tumor target cell which results in T cell mediated lysis of the tumor target. Also in common, these molecules recruit T cells via the CD3 protein located on the cell surface. An alternative to recruitment via CD3 is to make use of the $\alpha\beta$ T cell receptor ($\alpha\beta$ TCR) which is also expressed on the surface of the cell.

5 Accordingly, antibodies according to the present invention can be used to develop anti-tumor antibodies by combining a specificity for a tumor associated antigen with a specificity for the $\alpha\beta$ T cell receptor ($\alpha\beta$ TCR).

2. Antibody production

10 The amino acid sequences of the variable domains of the antibodies described herein are set forth in SEQ ID NOs: 5-7 and 12-16. Antibody production can be performed by any technique known in the art, including in transgenic organisms such as goats (see, Pollock *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157), chickens (see, Morrow, K.J.J. (2000) *Genet. Eng. News* 20:1-55), mice (see Pollock *et al.*, *supra*) or plants (see, 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). Antibodies may also be produced by chemical synthesis or by expression of genes encoding the antibodies in host cells.

20 A polynucleotide encoding the antibody is isolated and inserted into a replicable construct or vector such as a plasmid for further propagation or expression in a host cell. Constructs or vectors (e.g., expression vectors) suitable for the expression of a humanized immunoglobulin according to the described embodiments are available in the art. A variety of vectors are available, including vectors which are maintained in single copy or multiple copies in a host cell, or which become integrated into the host cell's
25 chromosome(s). The constructs or vectors can be introduced into a suitable host cell, and cells which express a humanized immunoglobulin can be produced and maintained in culture. A single vector or multiple vectors can be used for the expression of a humanized immunoglobulin.

30 Polynucleotides encoding the antibody are readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., oligonucleotide probes). Vectors that may be used include plasmid, virus, phage, transposons, minichromosomes of which plasmids are a typical embodiment. Generally such vectors further include a signal sequence, origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter and transcription termination sequences operably linked to the light and/or heavy chain polynucleotide so
35 as to facilitate expression. Polynucleotides encoding the light and heavy chains may be

inserted into separate vectors and introduced (e.g., by transformation, transfection, electroporation or transduction) into the same host cell concurrently or sequentially or, if desired, both the heavy chain and light chain can be inserted into the same vector prior to such introduction.

- 5 A promoter can be provided for expression in a suitable host cell. Promoters can be constitutive or inducible. For example, a promoter can be operably linked to a nucleic acid encoding a humanized immunoglobulin or immunoglobulin chain, such that it directs expression of the encoded polypeptide. A variety of suitable promoters for prokaryotic and eukaryotic hosts are available. Prokaryotic promoters include lac, tac, T3, T7 promoters
10 for *E. coli*; 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes e.g., enolase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose 6 phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase and glucokinase. Eukaryotic promoters include inducible yeast promoters such as alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, metallothionein and enzymes
15 responsible for nitrogen metabolism or maltose/galactose utilization; RNA polymerase II promoters including viral promoters such as polyoma, fowlpox and adenoviruses (e.g., adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus (in particular, the immediate early gene promoter), retrovirus, hepatitis B virus, actin, rous sarcoma virus (RSV) promoter and the early or late Simian virus 40 and non-viral promoters such as EF-
20 1 alpha (Mizushima and Nagata (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(17):5322). Those of skill in the art will be able to select the appropriate promoter for expressing a humanized antibody or portion thereof.

Where appropriate, e.g., for expression in cells of higher eukaryotes, additional enhancer elements can be included instead of or as well as those found located in the promoters
25 described above. Suitable mammalian enhancer sequences include enhancer elements from globin, elastase, albumin, fetoprotein, metallothionein and insulin. Alternatively, one may use an enhancer element from a eukaryotic cell virus such as SV40 enhancer, cytomegalovirus early promoter enhancer, polyoma enhancer, baculoviral enhancer or murine IgG2a locus (see, WO 04/009823). Whilst such enhancers are often located on the
30 vector at a site upstream to the promoter, they can also be located elsewhere e.g., within the untranslated region or downstream of the polyadenylation signal. The choice and positioning of enhancer may be based upon compatibility with the host cell used for expression.

In addition, the vectors (e.g., expression vectors) may comprise a selectable marker for
35 selection of host cells carrying the vector, and, in the case of a replicable vector, an origin

of replication. Genes encoding products which confer antibiotic or drug resistance are common selectable markers and may be used in prokaryotic (e.g., f3-lactamase gene (ampicillin resistance), Tet gene (tetracycline resistance) and eukaryotic cells (e.g., neomycin (G418 or geneticin), gpt (mycophenolic acid), ampicillin, or hygromycin resistance genes). Dihydrofolate reductase marker genes permit selection with methotrexate in a variety of hosts. Genes encoding the gene product of auxotrophic markers of the host (e.g., LEU2, URA3, HIS3) are often used as selectable markers in yeast. Use of viral (e.g., baculovirus) or phage vectors, and vectors which are capable of integrating into the genome of the host cell, such as retroviral vectors, are also contemplated.

In eukaryotic systems, polyadenylation and termination signals are operably linked to polynucleotide encoding the antibody of the invention. Such signals are typically placed 3' of the open reading frame. In mammalian systems, non-limiting examples of polyadenylation/termination signals include those derived from growth hormones, elongation factor-1 alpha and viral (e.g., SV40) genes or retroviral long terminal repeats. In yeast systems, non-limiting examples of polyadenylation/termination signals include those derived from the phosphoglycerate kinase (PGK) and the alcohol dehydrogenase 1 (ADH) genes. In prokaryotic systems polyadenylation signals are typically not required and it is instead usual to employ shorter and more defined terminator sequences. The choice of polyadenylation/termination sequences may be based upon compatibility with the host cell used for expression. In addition to the above, other features that can be employed to enhance yields include chromatin remodeling elements, introns and host cell specific codon modification. The codon usage of the antibodies of the invention can be modified to accommodate codon bias of the host cell such to augment transcript and/or product yield (e.g., Hoekema, A. *et al.* (1987) *Mol. Cell Biol.* 7(8):2914-24). The choice of codons may be based upon compatibility with the host cell used for expression.

The invention thus relates to isolated nucleic acid molecules that encode the humanized immunoglobulins, or heavy or light chains, thereof. The invention also relates to isolated nucleic acid molecules that encode an antigen-binding portion of the immunoglobulins and their chains.

The antibodies can be produced, for example, by the expression of one or more recombinant nucleic acids encoding the antibody in a suitable host cell. The host cell can be produced using any suitable method. For example, the expression constructs (e.g., one or more vectors, e.g., a mammalian cell expression vector) described herein can be introduced into a suitable host cell, and the resulting cell can be maintained (e.g., in

culture, in an animal, in a plant) under conditions suitable for expression of the construct(s) or vector(s). Host cells can be prokaryotic, including bacterial cells such as *E. coli* (e.g., strain DH5a™) (Invitrogen, Carlsbad, CA), PerC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* and/or other suitable bacteria; eukaryotic cells, such as fungal or yeast cells (e.g.,
5 *Pichia pastoris*, *Aspergillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), or other lower eukaryotic cells, and cells of higher eukaryotes such as those from insects (e.g., *Drosophila* Schneider S2 cells, Sf9 insect cells) (WO 94/126087 (O'Connor)), BTI-TN-5B1-4 (High Five™) insect cells (Invitrogen), mammals (e.g., COS cells, such as COS-1 (ATCC Accession No. CRL-1650) and COS-7
10 (ATCC Accession No. CRL-1651), CHO (e.g., ATCC Accession No. CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7):4216-4220), 293 (ATCC Accession No. CRL-1573), HeLa (ATCC Accession No. CCL-2), CV1 (ATCC Accession No. 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. U.S.A.*, 90:8392-8396), NSO cells, SP2/0
15 cells, HuT 78 cells, and the like, or plants (e.g., tobacco, lemna (duckweed), and algae). See, for example, Ausubel, F.M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993). In some embodiments, the host cell is not part of a multicellular organism (e.g., plant or animal), e.g., it is an isolated host cell or is part of a cell culture.

20 Host cells may be cultured in spinner flasks, shake flasks, roller bottles, wave reactors (e.g., System 1000 from wavebiotech.com) or hollow fibre systems but it is preferred for large scale production that stirred tank reactors or bag reactors (e.g., Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA) are used particularly for suspension cultures. Stirred tank reactors can be adapted for aeration using e.g., spargers, baffles or low shear impellers.
25 For bubble columns and airlift reactors, direct aeration with air or oxygen bubbles maybe used. Where the host cells are cultured in a serum-free culture medium, the medium can be supplemented with a cell protective agent such as pluronic F-68 to help prevent cell damage as a result of the aeration process. Depending on the host cell characteristics, microcarriers maybe used as growth substrates for anchorage dependent cell lines, or the
30 cells maybe adapted to suspension culture. The culturing of host cells, particularly vertebrate host cells, may utilize a variety of operational modes such as batch, fed-batch, repeated batch processing (see, Drapeau et al. (1994) *Cytotechnology* 15:103-109), extended batch process or perfusion culture. Although recombinantly transformed mammalian host cells may be cultured in serum-containing media such media comprising
35 fetal calf serum (FCS), it is preferred that such host cells are cultured in serum-free media such as disclosed in Keen et al. (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, or commercially

available media such as ProCHO-CDM or UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), supplemented where necessary with an energy source such as glucose and synthetic growth factors such as recombinant insulin. The serum-free culturing of host cells may require that those cells are adapted to grow in serum-free conditions. One adaptation approach is to culture such host cells in serum containing media and repeatedly exchange 80% of the culture medium for the serum-free media so that the host cells learn to adapt in serum-free conditions (see, e.g., 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).

Antibodies according to the described embodiments may be secreted into the medium and recovered and purified therefrom using a variety of techniques to provide a degree of purification suitable for the intended use. For example, the use of therapeutic antibodies for the treatment of human patients typically mandates at least 95% purity as determined by reducing SDS-PAGE, more typically 98% or 99% purity, when compared to the culture media comprising the therapeutic antibodies. In the first instance, cell debris from the culture media can be removed using centrifugation followed by a clarification step of the supernatant using e.g., microfiltration, ultrafiltration and/or depth filtration. Alternatively, the antibody can be harvested by microfiltration, ultrafiltration or depth filtration without prior centrifugation. A variety of other techniques such as dialysis and gel electrophoresis and chromatographic techniques such as hydroxyapatite (HA), affinity chromatography (optionally involving an affinity tagging system such as polyhistidine) and/or hydrophobic interaction chromatography (HIC) (see, US 5,429,746) are available. In one embodiment, the antibodies, following various clarification steps, are captured using Protein A or G affinity chromatography followed by further chromatography steps such as ion exchange and/or HA chromatography, anion or cation exchange, size exclusion chromatography and ammonium sulphate precipitation. Various virus removal steps may also be employed (e.g., nanofiltration using, e.g., a DV-20 filter). Following these various steps, a purified preparation comprising at least 10 mg/ml or greater, e.g., 100 mg/ml or greater of the antibody of the invention is provided and, therefore, forms another embodiment of the invention. Concentration to 100 mg/ml or greater can be generated by ultracentrifugation. Such preparations are substantially free of aggregated forms of antibodies of the invention.

Bacterial systems are particularly suited for the expression of antibody fragments. Such fragments are localized intracellularly or within the periplasm. Insoluble periplasmic proteins can be extracted and refolded to form active proteins according to methods

known to those skilled in the art, see, Sanchez *et al.* (1999) *J. Biotechnol.* 72:13-20; Cupit, P.M. *et al.* (1999) *Letf. Appl. Microbiol.* 29:273-277.

The present invention also relates to cells comprising a nucleic acid, *e.g.*, a vector, of the invention (*e.g.*, an expression vector). For example, a nucleic acid (*i.e.*, one or more nucleic acids) encoding the heavy and light chains of a humanized immunoglobulin according to the described embodiments, or a construct (*i.e.*, one or more constructs, *e.g.*, one or more vectors) comprising such nucleic acid(s), can be introduced into a suitable host cell by a method appropriate to the host cell selected (*e.g.*, transformation, transfection, electroporation, infection), with the nucleic acid(s) being, or becoming, operably linked to one or more expression control elements (*e.g.*, in a vector, in a construct created by processes in the cell, integrated into the host cell genome). Host cells can be maintained under conditions suitable for expression (*e.g.*, in the presence of inducer, suitable media supplemented with appropriate salts, growth factors, antibiotic, nutritional supplements, *etc.*), whereby the encoded polypeptide(s) are produced. If desired, the encoded humanized antibody can be isolated, for example, from the host cells, culture medium, or milk. This process encompasses expression in a host cell (*e.g.*, a mammary gland cell) of a transgenic animal or plant (*e.g.*, tobacco) (see, *e.g.*, WO 92/03918).

3. Therapeutic Applications

Suppression of T cell activity is desirable in a number of situations in which immunosuppression is warranted, and/or an autoimmune condition occurs. Accordingly, targeting of the $\alpha\beta$ TCR.CD3 complex is indicated in the treatment of diseases involving an inappropriate or undesired immune response, such as inflammation, autoimmunity, and other conditions involving such mechanisms. In one embodiment, such disease or disorder is an autoimmune and/or inflammatory disease. Examples of such autoimmune and/or inflammatory diseases are Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Rheumatoid Arthritis (RA) and inflammatory bowel disease (IBD) (including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD)), multiple sclerosis (MS), scleroderma and type 1 diabetes (T1D), and other diseases and disorders, such as PV (pemphigus vulgaris), psoriasis, atopic dermatitis, celiac disease, Chronic Obstructive Lung disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease (thyroid), Sjogren's syndrome, Guillain-barré syndrome, Goodpasture's syndrome, Addison's disease, Wegener's granulomatosis, primary biliary sclerosis, sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis, polymyalgia rheumatica, Raynaud's phenomenon, temporal arteritis, giant cell arteritis, autoimmune hemolytic anemia,

pernicious anemia, polyarteritis nodosa, behcet's disease, primary biliary cirrhosis, uveitis, myocarditis, rheumatic fever, ankylosing spondylitis, glomerulonephritis, sarcoidosis, dermatomyositis, myasthenia gravis, polymyositis, alopecia areata, and vitiligo.

In one embodiment, such disease or disorder is SLE, RA or IBD. In one embodiment,
5 such disease or disorder is MS.

In another embodiment, the antibodies according to the described embodiments are used to aid transplantation by immunosuppressing the subject. Such use alleviates graft-versus-host disease. For a description of existing treatments for graft-versus-host disease, see, e.g., Svennilson, *Bone Marrow Transplantation* (2005) 35:S65–S67, and
10 references cited therein. Advantageously, the antibodies of the invention may be used in combination with other available therapies.

With regard to the treatment of autoimmune diseases, combination therapy may include administration of an antibody of the present invention together with a medicament, which together with the antibody comprises an effective amount for preventing or treating such
15 autoimmune diseases. Where said autoimmune disease is Type 1 diabetes, the combination therapy may encompass one or more of an agent that promotes the growth of pancreatic beta-cells or enhances beta-cell transplantation, such as beta cell growth or survival factors or immunomodulatory antibodies. Where said autoimmune disease is rheumatoid arthritis, said combination therapy may encompass one or more of
20 methotrexate, an anti-TNF- β antibody, a TNF- β receptor-Ig fusion protein, an anti-IL-15 or anti-IL-21 antibody, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), or a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD). For example, the additional agent may be a biological agent such as an anti-TNF agent (e.g., Enbrel®, infliximab (Remicade®) and adalimumab (Humira®) or rituximab (Rituxan®). Where said autoimmune disease is
25 hematopoietic transplant rejection, hematopoietic growth factor(s) (such as erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-11, thrombopoietin, etc.) or antimicrobial(s) (such as antibiotic, antiviral, antifungal drugs) may be administered. Where said autoimmune disease is psoriasis, the additional agent may be one or more of tar and derivatives thereof, phototherapy, corticosteroids, Cyclosporine A, vitamin D analogs, methotrexate, p38
30 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitors, as well as biologic agents such as anti-TNF- agents and Rituxan®. Where said autoimmune disease is an inflammatory bowel disease (IBD) such as, for example, Crohn's Disease or ulcerative colitis, the additional agent may be one or more of aminosaliclates, corticosteroids, immunomodulators, antibiotics, or biologic agents such as Remicade® and Humira®.

The combination treatment may be carried out in any way as deemed necessary or convenient by the person skilled in the art and for the purpose of this specification, no limitations with regard to the order, amount, repetition or relative amount of the compounds to be used in combination is contemplated. Accordingly, the antibodies
5 according to the described embodiments may be formulated into pharmaceutical compositions for use in therapy.

4. Pharmaceutical Compositions

In a preferred embodiment, there is provided a pharmaceutical composition comprising an antibody according to the invention, or a ligand or ligands identifiable by an assay method
10 as defined in the previous aspect of the invention. Ligands may be immunoglobulins, peptides, nucleic acids or small molecules, as discussed herein. They are referred to, in the following discussion, as "compounds".

A pharmaceutical composition according to the invention is a composition of matter comprising a compound or compounds capable of modulating T cell activity as an active
15 ingredient. The compound is in the form of any pharmaceutically acceptable salt, or *e.g.*, where appropriate, an analog, free base form, tautomer, enantiomer racemate, or combination thereof. The active ingredients of a pharmaceutical composition comprising the active ingredient according to the invention are contemplated to exhibit therapeutic activity, for example, in the treatment of graft-versus-host disease, when administered in
20 amount which depends on the particular case.

In another embodiment, one or more compounds of the invention may be used in combination with any art recognized compound known to be suitable for treating the particular indication in treating any of the aforementioned conditions. Accordingly, one or more compounds of the invention may be combined with one or more art recognized
25 compounds known to be suitable for treating the foregoing indications such that a convenient, single composition can be administered to the subject. Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum therapeutic response.

For example, several divided doses may be administered daily or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.

30 The active ingredient may be administered in a convenient manner such as by the oral, intravenous (where water soluble), intramuscular, subcutaneous, intranasal, intradermal or suppository routes or implanting (*e.g.*, using slow release molecules).

Depending on the route of administration, the active ingredient may be required to be coated in a material to protect said ingredients from the action of enzymes, acids and other natural conditions which may inactivate said ingredient.

In order to administer the active ingredient by means other than parenteral administration, it will be coated by, or administered with, a material to prevent its inactivation. For example, the active ingredient may be administered in an adjuvant, co-administered with enzyme inhibitors or in liposomes. Adjuvant is used in its broadest sense and includes any immune stimulating compound such as interferon. Adjuvants contemplated herein include resorcinols, non-ionic surfactants such as polyoxyethylene oleyl ether and n-hexadecyl polyethylene ether. Enzyme inhibitors include pancreatic trypsin.

Liposomes include water-in-oil-in-water CGF emulsions as well as conventional liposomes.

The active ingredient may also be administered parenterally or intraperitoneally.

Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (*for example*, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, *and the like*), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants.

The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In certain cases, it may be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable

compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active ingredient in the required amount in the appropriate solvent with several of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the sterilized active ingredient into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and the freeze-drying technique which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from previously sterile-filtered solution thereof.

Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. Of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active ingredient may be incorporated into sustained-release preparations and formulations.

As used herein "pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, use thereof in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active material calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the novel dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active material and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such as active material for the treatment of disease in living subjects having a diseased condition in which bodily health is impaired.

The principal active ingredients are compounded for convenient and effective administration in effective amounts with a suitable pharmaceutically acceptable carrier in dosage unit form. In the case of compositions containing supplementary active ingredients, the dosages are determined by reference to the usual dose and manner of administration of the said ingredients.

In order to facilitate delivery of peptide compounds, including antibodies, to cells, peptides may be modified in order to improve their ability to cross a cell membrane. For example, US 5,149,782 discloses the use of fusogenic peptides, ion-channel forming peptides, membrane peptides, long-chain fatty acids and other membrane blending agents to increase protein transport across the cell membrane. These and other methods are also described in WO 97/37016 and US 5,108,921, incorporated herein by reference.

In a further aspect there is provided the active ingredient of the invention as hereinbefore defined for use in the treatment of disease either alone or in combination with art recognized compounds known to be suitable for treating the particular indication. Consequently there is provided the use of an active ingredient of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of disease associated with an aberrant immune response.

Moreover, there is provided a method for treating a condition associated with an aberrant immune response, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of a ligand identifiable using an assay method as described above.

The invention is further described, for the purposes of illustration only, in the following examples.

Comparative Example 1

Binding and biological activity of EuCIV3 is decreased compared with BMA031

Using flow cytometry, we have shown that EuCIV3 is inferior to BMA031 in T cell binding (Fig. 1). In this competition assay, T cells were incubated on ice in the presence of a fixed concentration of directly Phycoerythrin-labeled MolgG2b-BMA031 (murine competitor) and an increasing concentration of anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies. After 20 minutes incubation, the cells were washed and surface bound directly Phycoerythrin-labeled MolgG2b-BMA031 was detected by flow cytometry. The BMA031 HuIgG1 chimeric antibody competes much more effectively than EuCIV3.

In order to assess its ability to inhibit T cell activity *in vivo*, CD8⁺ T cells were treated with anti- $\alpha\beta$ TCR antibodies at various concentrations (see, Fig. 2, x-axis) and co-cultured with

autologous dendritic cells (DCs) pulsed with the CMV peptide 495-503 (pp65) for seven days in an *in vitro* education (IVE) assay.

Normal donor aphaeresis products from HLA-A2⁺ individuals were obtained from HemaCare Corp., Van Nuys, CA). PBMC were isolated by centrifugation over Ficoll (GE Healthcare, Piscataway, NJ). CD8⁺ T cells were isolated using magnetic beads (Invitrogen, Carlsbad, California) according to the manufacturer's instructions. To generate autologous immature dendritic cells, PBMC were resuspended in RPMI 1640/5% human AB serum (Sigma), plated in triple flasks (Corning) and incubated for more than 2 hours at 37°C/5%CO₂. The adherent monocytes were then rinsed with PBS and cultured for 6 days in RPMI 1640/5% human AB serum supplemented with GM-CSF (Immunex, Seattle, WA) and IL-4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Prior to establishing the T cell/DC co-cultures, the DCs were pulsed with peptides (10ug/ml) for 4 hours and then matured. Mature dendritic cells were generated by the addition of 50ng/ml TNF-alpha, 25ng/ml IL-1β, 10ng/ml IL-6, 500ng/ml PGE-2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) and culturing the dendritic cells for an additional 24 hours. The peptide-pulsed DCs were then added to the previously isolated CD8⁺ T cells at a T:DC ratio of 10:1. Cultures were immediately fed with IL-2 (100 IU/ml) added to the cultures. The cultures were supplemented with IL-2 (100 IU/ml) on day 4. The bulk cultures were assayed for peptide reactivity in a chromium release assay on day 7.

The graph in Fig. 2 shows lysis data from the chromium release assay, where untreated T cells were successfully educated against pp65 peptide and able to lyse specific targets at >50%. BMA031 inhibited education of these T cells, as they were unable to lyse specific targets in a dose-dependent manner. Humanized antibody EuCIV3 was less potent than BMA031 and was only able to inhibit education at the highest dose.

Example 2

Fc Engineering of BMA031 chimeric antibodies

In vitro profile

We have assessed the *in vitro* profile of BMA031 in a panel of assays. Table 1 shows the *in vitro* profile of BMA031. BMA031 is compared to OKT3 in these assays.

In the PBMC proliferation assay, human PBMC were cultured with increasing concentrations of therapeutic antibody for 72 hours, ³H-thymidine was added and cells were harvested 18 hours later.

For the T cell depletion/Cytokine Release assay, human PBMC were cultured with increasing concentrations of therapeutic antibody and were analyzed daily for cell counts

and viability (Vi-Cell, Beckman Coulter) out to day 7. Cell supernatants were also harvested, stored at -20°C and analyzed on an 8-plex cytokine panel (Bio-Rad).

BMA031 does not induce: (i) PBMC proliferation; (ii) T cell depletion; (iii) CD25 expression; or (iv) cytokine release. In contrast, OKT3 does induce all of the
5 aforementioned effects. BMA031 and OKT3 are capable of blocking the education of CD8+ cells to peptide in an *in vitro* education (IVE) assay and are also capable of blocking a mixed lymphocyte reaction (MLR). BMA031 also induces apoptosis of activated T cells (activation-induced cell death; AICD).

Unlike BMA031, a chimeric version of BMA031 (HulG1), with wild-type human IgG1
10 constant region, had an *in vitro* profile comparable to OKT3 (Table 1). We postulated that FcγR involvement was critical for this change of *in vitro* profile for HulG1 BMA031 compared to BMA031 MolG2b. Therefore we made F(ab')₂ fragments of BMA031 HulG1 and found these to recover the profile of BMA031 MolG2b. By Fc engineering we incorporated modifications that removed FcγR binding in mutations known as "delta
15 ab" (Armour *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.*, 29:2613-2624) and by generating an aglycosylated form of HulG4 (N297Q). HulG1 delta ab and HulG4 agly anti-αβTCR antibodies had the same *in vitro* profile as BMA031 MolG2b (Table 1).

	Normal PBMC							Antigen Activated T-cells		
	γδTCR binding	αβTCR binding	FcγR binding	PBMC Proliferation	Depletion	CD25 Expression	Cytokine Release	MLR Inhibition	Apoptosis / AICD	IVE Inhibition
OKT3	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
BMA031 MolG2b	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
BMA031 HulG1	-	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
BMA031 F(ab) ₂	-	+	-	-	-	-	-	ND	ND	+
BMA031 Δab HulG1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
HEBE1 Δab HulG1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
HEBE1 IgG4 agly	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Table 1

Example 3

Construction of humanized antibodies with improved binding

We have generated two series of humanized versions of BMA031 called HEBE1 series
25 (IGH3-23) and GL1BM series (IGHV1-3*01 & IGKV3-11*01; see, VBase, vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk). Initial grafting of BMA031 heavy chain CDR regions onto IGH3-23

framework regions (see, SEQ ID NOs: 5 and 6) improved the binding of the antibody to the $\alpha\beta$ TCR as shown by a competition assay (Fig. 3); see, Example 2. However, this improvement did not translate into a functional improvement in the antibody as shown by an IVE assay (Fig. 4).

5 Example 4

Optimization of humanized antibodies

The strategy for optimization of the humanized antibodies was based upon mutagenesis and functional screening. Optimization was started with block changes of amino acid residues in one of each of the four framework regions of the variable domains, from
10 mouse to human. Key framework regions were identified in each of the GL1BM HC, GL1BM LC and HEBE1 HC series. Following this identification, individual residues within those framework regions were mutated to human germline residues from the original mouse sequence. Framework residues for which identity with the mouse sequence was found to be important to retaining the binding properties of the antibody were retained as
15 mouse residues. Otherwise, framework residues were changed to match the human germline amino acid sequence. This was continued across the sequence until the minimal number of mouse residues, to retain the original binding properties of the antibody, were identified. See Fig. 5. We have demonstrated that several of the antibodies from these series have an improved binding compared to BMA031 as
20 determined by antibody off-rate from T cells (Figs. 6, 7 and 8).

For off-rate assays, 10^5 human T cells were incubated for 30-60 minutes at room temperature in 100uL full growth media containing 2ug/mL of the antibodies expressed as HulgG1- Δ ab. The cells were then washed, resuspended in 50uL full growth media and
25 20ug/mL of HEBE1 F(ab')₂ was added in order to prevent the rebinding of the dissociated candidate antibodies. At the end of this time course assay, the cells were fixed and the level of remaining HulgG1- Δ ab antibody bound to the cell surface was measured by flow cytometry via a PE labeled goat anti-HulgG secondary antibody.

We have also demonstrated that the antibodies are active in preventing the immune
30 response in an IVE (Figs. 9, 10 and 11) and a MLR assay. In the IVE assay, tetramer binding was used as a quantitative measurement for the IVE. The percentage of cells which were antigen specific was determined by staining the T cells with a directly labeled tetramer that is specific for the educating peptide. Briefly, day 7 CD8+ T cells from the IVE were stained with tetramer by standard flow cytometry staining protocols and analyzed on

BD FACSCalibur. In addition, the humanized antibodies demonstrated comparable levels of proliferative potential on PBMCs and cytokine release as compared to BMA031 (Figs. 12 and 13).

The antibodies also showed an ability to inhibit the release of IFN γ from T cells in an IVE assay (Fig. 14). In addition we have shown that a number of these antibodies have an improved ability to elicit activation-induced cell death (AICD) of activated $\alpha\beta$ TCR-positive T cells compared to BMA031 (Fig. 15). In the AICD assay, antigen-specific CD8 $^{+}$ T cells were cultured with therapeutic antibody. At 24 hours, 48 hours and 72 hours cells were stained for apoptosis markers Annexin-V and 7-AAD. Cells were also stained with tetramer to track apoptosis with effects on antigen-specific T cells.

In conclusion, we have made significant improvement over previous attempts to humanize BMA031. The discovery of antibodies with an improved off-rate compared to BMA031 is an unexpected finding via this process. This improvement in binding correlates with an improvement in potency to suppress an immune response as demonstrated in the IVE assay (Figs. 10 and 11). The specificity of the antibodies for $\alpha\beta$ TCR, the decreased immunogenicity by humanization, the specific apoptosis of activated T cells and the lack of T cell activation upon antibody binding make these antibodies excellent candidates for therapeutic purposes.

Example 5

Generation of Fc mutants for reduced effector function.

Engineered Fc variants was designed and generated where a glycosylation site is introduced at amino acid Ser 298 position, next to the naturally-occurring Asn297 site. The glycosylation at Asn297 was either kept or knocked out by mutations. Mutations and glycosylation results are set forth in Table 2.

#	Mutation	Predicted result	Expected Benefit
1	N297Q	No glycosylation	Agly Control
2	T299A	No glycosylation	Agly Control, unknown effector function
3	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	No glycosylation at 297 but engineered glycosylation site at 298	Reduced effector function
4	S298N/T299A/Y300S (STY)	No glycosylation at 297 but engineered glycosylation site at 298	Reduced effector function
5	S298N/Y300S (SY)	Two potential glycosylation sites at 297 & 298; Double glycosylation? Mixed glycosylation?	Positive control for reduced effector function

Table 2

Mutations were made on the heavy chain of $\alpha\beta$ T-cell receptor antibody clone #66 by Quikchange using a pENTR_LIC_IgG1 template. The VH domain of HEBE1 Δ ab IgG1 #66 was amplified with LIC primers, and cloned into mutated or wild type pENTR_LIC_IgG1 by LIC to create a full-length Ab mutants or wild type. The subcloning was verified with DraIII/XhoI double digest, producing ~1250 bp insert in the successful clones. Those full-length mutants were then cloned into an expression vector, pCEP4(-E+I)Dest, via Gateway cloning. The mutations were then confirmed by DNA sequencing.

Two constructs, HEBE1 Agly IgG4 and HEBE1 Δ ab IgG1 in pCEP4, were used as controls in HEK293 transfection.

The mutants, wt and controls (Agly and Δ ab) were transfected into HEK293-EBNA cells in triple-flask for expression. Proteins were purified from 160 ml of conditioned media (CM) with 1 ml HiTrap protein A columns (GE) on multichannel peristaltic pump. Five

micrograms of each supernatant were analyzed on 4-20% Tris-Glycine reducing and non-reducing SDS-PAGE (see Figure 16). The heavy chain of the aglycosylated mutants (N297Q, T299A, and Agly control, is lower (arrow in black), consistent with the loss of the glycans in these antibody. The heavy chains of the engineered glycosylated antibodies (NSY, STY, SY, Δ ab, and wt control, arrows in red), however, migrate the same way as the wild-type control. This result is consistent with the expected outcome of engineered glycosylation site at 298 positions. SEC-HPLC analysis indicated that all mutants are expressed as monomers.

Glycosylation analysis by LC-MS.

- 10 The Engineered H66 IgG1 Fc variants were partially reduced with 20mM DTT at 37°C for 30 min. The samples were analyzed by capillary LC/MS on an Agilent 1100 capillary HPLC system coupling with a QSTAR qq TOF hybrid system (Applied Biosystem). Bayesian protein reconstruct with baseline correction and computer modeling in Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem) was used for data analysis. For mutant S298N/T299A/Y300S
- 15 H66 antibody lead, one glycosylation site was observed at amino acid 298 with bi-antennary and tri- antennary complex-type glycans detected as the major species, as well as G0F, G1F and G2F.

Binding of α BTCT antibody mutants to human Fc γ RIIIa and Fc γ RI using Biacore.

- Biacore was used to assess binding to recombinant human Fc γ RIIIa (V158 & F158) and
- 20 Fc γ RI. All 4 flowcells of a CM5 chip were immobilized with anti-HPC4 antibody via the standard amine coupling procedure provided by Biacore. The anti-HPC4 antibody was diluted to 50 μ g/mL in 10mM sodium acetate pH 5.0 for the coupling reaction and injected for 25 min at 5 μ L/min. Approximately 12,000 RU of antibody was immobilized to the chip surface. Recombinant human Fc γ RIIIa-V158 and Fc γ RIIIa-F158 were diluted to 0.6 μ g/mL
- 25 in binding buffer, HBS-P with 1mM CaCl₂, and injected to flowcells 2 and 4, respectively, for 3 min at 5 μ L/min to capture 300 – 400 RU receptor to the anti-HPC4 chip. In order to distinguish between the low binders, three times more rhFc γ RIIIa was captured to the anti-HPC4 surface than usually used in this assay. Flowcells 1 and 3 were used as reference controls. Each antibody was diluted to 200nM in binding buffer and injected
- 30 over all 4 flowcells for 4 min, followed by 5 min dissociation in buffer. The surfaces were regenerated with 10mM EDTA in HBS-EP buffer for 3 min at 20 μ L/min.

The results are shown in Figure 17.

Biacore was also used to compare the FcγRI binding. Anti-tetra His antibody was buffer exchanged into 10mM sodium acetate pH 4.0 using a Zeba Desalting column and diluted to 25μg/mL in the acetate buffer for amine coupling. Two flowcells of a CM5 chip were immobilized with ~9000 RU of the anti-Tetra-His antibody after 20 min injection at 5μL/min. Similar to the previous experiment, ten times more FcγRI was captured to the anti-tetra-His surface in order to compare weak binders. Recombinant human FcγRI was diluted 10μg/mL in HBS-EP binding buffer and injected to flowcell 2 for 1 min at 5μL/min to capture ~1000 RU receptor to the anti-tetra-His chip. A single concentration of antibody, 100nM, was injected for 3 min at 30μL/min over the captured receptor and control surface. Dissociation was monitored for 3 min. The surface was regeneration with two 30 sec injections of 10mM glycine pH 2.5 at 20μL/min.

The results are shown in Figure 18.

The result suggests very little binding of the glycoengineered mutants to FcγRIIIa or FcγRI. H66 S298N/T299A/Y300S in particular has almost completely abolished binding to both receptors. This mutant was chosen as the lead for detailed characterization.

Stability characterization using Circular Dichroism (CD).

The stability of the S298N/T299A/Y300S antibody mutant was monitored by a Far-UV CD thermo melting experiment where the CD signal at 216nm and 222nm was monitored as temperature increases that eventually leads to the unfolding of the antibody. The CD spectra were collected on a Jasco 815 spectrophotometer at a protein concentration of approximately 0.5 mg/mL in PBS buffer in a quartz cuvette (Hellma, Inc) with a path length of 10 mm. Temperature was controlled by a thermoelectric peltier (Jasco model AWC100) and was ramped at a rate of 1°C/min from 25-89 °C. CD signal and HT voltage were both collected. Data was obtained from 210-260 nm with data intervals of 0.5 nm and at temperature intervals of 1 °C. The scanning speed was 50 nm/min and a data pitch of 0.5 nm. A bandwidth of 2.5 nm was used with a sensitivity setting of medium. 4 replicate scans were performed for each sample. The result suggest that both delta AB H66 and the S298N/T299A/Y300S H66 mutant show similar thermal behavior and have the same onset temperature for degradation around 63C. In other word, the mutant is as stable as the delta AB format.

See Figure 18.

Example 6

Functional analysis of Fc-engineered mutants

PBMC proliferation and cytokine release assays were conducted as set forth in Example 2. Normal donor PBMC were thawed and treated under the following conditions (all in media containing complement):

- 5 • Untreated
 - BMA031, molgG2b 10ug/ml
 - OKT3, molgG2a 10ug/ml
 - H66, hulgG1 deltaAB 10ug/ml, 1ug/ml and 0.1ug/ml
 - H66, hulgG1 S298N/T299A/Y300S 10ug/ml, 1ug/ml and 0.1ug/ml
- 10 Cytokines were harvested at day 2 (D2) and day 4 (D4) for Bioplex Analysis (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFN γ , TNF α). Cells were stained at D4 for CD4, CD8, CD25 and abTCR expression.

The results, shown in Figures 19-22, demonstrate that H66 S298N/T299A/Y300S behaved similarly to the H66 deltaAB in all cell based assays, showing minimal T-cell
15 activation by CD25 expression; binding to abTCR, although with slightly different kinetics to deltaAB; minimal cytokine release at both D2 and D4 time points; the mutant was in fact superior to deltaAB at D4 in respect of several of the cytokines.

The S298N/T299A/Y300S mutant thus eliminated effector function as effectively as the deltaAB mutation.

20 **Example 7**

Bispecific antibodies

Bi-specific molecules were constructed comprised of two single chain antibodies (scFv) linked together via a short amino acid linker whereby one arm is capable of binding a tumor target and the other capable of binding T cells via the $\alpha\beta$ TCR. The bispecific
25 molecule is referred to herein as a TRACER (T cell Receptor Activated Cytotoxic EnableR).

The following humanized anti- $\alpha\beta$ TCR scFv constructs were made:

GL1BMΔSxVK1

GL1BMΔSxVK27

GL1BMΔSVH11xVK1

GL1BMΔSVH15xVK1

5 GL1BMΔSVH28xVK43

GL1BMΔSVH31xVK43

The sequences of the heavy and light chains are set forth in SEQ ID nos 14-16 and 20-24

10 Characterization of these molecules comprised an assessment of binding to tumor target and T cells, *in vitro* cytotoxic activity and cytokine release profile in the presence and absence of tumor target cells.

The binding profile assessed by flow cytometry shows that anti- $\alpha\beta$ TCR bi-specific antibodies are able to bind both the tumor target cell line and T cells. See Figure 23.

15 *In vitro* cytotoxic activity measured by flow cytometry shows that T cells recruited via anti- $\alpha\beta$ TCR bi-specific antibody are capable of inducing T cell mediated lysis. See Figure 24.

20 Analysis of the cytokine release profile has shown that upon binding of both arms of the bi-specific antibody there is a high level of TH1/TH2 cytokine release from the T cells which is not seen in the absence of target cells. Taken together this mechanism of action shows a similar profile to that of the CD3 based bispecifics described in the literature.

Example 8: Preparation and characterization of an engineered Fc variant in anti-CD52 antibody.

25 In order to test the generality of the applicability of the Fc mutations described herein, glycosylation mutant S298N/Y300S was also prepared in an anti-CD52 antibody (clone 2C3) to see whether the effector function modulation with the loss of Fc γ RIII binding applies to a different antibody backbone. S298N/Y300S 2C3 variant DNA was prepared by quick change mutagenesis. The protein was purified from conditioned media after HEK293 transient transfection. Anti-CD52 2C3 wild-type antibody was produced in parallel

as a control. Biacore was used to characterize the antigen-binding, FcγRIII, and binding properties of the purified antibodies (see Figure 26).

5 The S298N/Y300S 2C3 variant binds to CD52 peptide tightly and the binding sensorgram is undistinguishable with the wild-type control, suggesting that this mutation on the Fc domain does not affect its antigen binding (Figure 26A).

To assay Fc effector function, FcγRIII receptor (Val158) was used in binding studies. The mutant and wild-type control antibody were diluted to 200nM and injected to HPC4-tag captured FcγRIIIa. FcγRIII binding is almost undetectable for the S298N/Y300S mutant, which indicates loss of effector function with this variant (Figure 26B). The mutant also
10 binds to FcRn receptor with the same affinity as the wild-type antibody control so we expect no change in its circulation half-life or other pharmacokinetic properties. (see Figure 26C). We conclude that the S298N/Y300S mutation is applicable to antibodies in general, to reduce or eliminate undesired Fc effector function, for example through engagement of human Fcγ receptors.

15

Claims

1. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex which comprises a heavy chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NOs: 7, 12 or 13 and a human IGH3-23 framework set forth in SEQ ID NO: 17, wherein
5 framework position 6 is a donor residue.
2. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex which comprises a heavy chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NOs: 7, 12 or 13 and a human IGH3-23 framework set forth in SEQ ID NO: 17, wherein framework position 18 is a donor residue.
- 10 3. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex according to claim 1 or 2, wherein framework positions 49 and/or 69 are donor residues.
4. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex which comprises a heavy chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NOs: 15 or 16 and a human IGHV1-3*01 framework set forth in SEQ ID NO: 18, wherein
15 one or more of framework positions 38, 44 and/or 48 is a donor residue.
5. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex which comprises a heavy chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NOs: 15 or 16 and a human IGHV1-3*01 framework set forth in SEQ ID NO: 18, wherein framework positions 44 and 48 are donor residues.
- 20 6. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex which comprises a light chain variable region comprising the CDRs set forth in SEQ ID NO: 14 and a human IGKV3-11*01 framework set forth in SEQ ID NO: 19, wherein framework positions 70 and/or 71 are donor residues.
7. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex
25 according to claim 6, wherein framework position 46 is a donor residue.
8. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex which comprises a heavy chain variable region selected from the heavy chains comprising the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 and SEQ ID NO: 13, and a light chain variable region sequence comprising the amino acid sequence as set
30 forth in SEQ ID NO: 14.

9. A humanized monoclonal antibody specific for the human $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex which comprises a heavy chain variable region selected from the heavy chains comprising the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 16, and a light chain variable region comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO 14.
- 5 10. A humanized antibody according to any preceding claim, further comprising a constant region of human origin.
11. A humanized antibody according to claim 10, further comprising an Fc modification which reduces Fc γ receptor binding.
12. A humanized antibody according to claim 11, which comprises an aglycosylated Fc region or a delta ab modification.
- 10 13. A humanized antibody according to claim 11, which comprises a modified glycosylation pattern.
14. A humanized antibody according to claim 13, comprising one or more of mutations S298N, T299A and Y300S.
- 15 15. A humanized antibody according to claim 14, comprising two or more of mutations N297Q, S298N, T299A and Y300S.
16. A humanized antibody according to claim 14, comprising the multiple mutations N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S or S298N/Y300S.
17. A nucleic acid encoding at least a heavy chain variable region of a humanized monoclonal antibody according to any one of claims 1 to 16.
- 20 18. A cell which expresses a nucleic acid according to claim 17.
19. A humanized antibody according to any one of claims 1 to 16 for use in suppressing a T cell mediated response in a subject.
20. A humanized antibody according to claim 19, wherein the T cell mediated response is involved in a condition selected from tissue transplantation, including solid organ transplant and composite tissue transplant, tissue grafting, multiple sclerosis and type 1 diabetes.
- 25

21. An antibody comprising a modified Fc, in which said modified Fc comprises a modified glycosylation pattern which reduces Fc γ receptor binding, comprising one or more of mutations S298N, T299A and Y300S.

22. An antibody according to claim 21, comprising two or more of mutations N297Q,
5 S298N, T299A and Y300S.

23. An antibody according to claim 14, comprising the multiple mutations N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S or S298N/Y300S.

24. An antibody according to any one of claims 21 to 23, wherein the antibody is a humanized antibody according to any one of claims 1 to 10.

10 25. A multispecific antibody comprising at least a heavy chain of a first binding domain according to any one of claims 1 to 9, and a second binding domain specific for a tumor-specific antigen.

26. A multispecific antibody according to claim 25, which comprises at least a heavy chain of a binding domain according to any one of claims 4, 5 or 9.

15 27. A multispecific antibody according to claim 25 or claim 26, which comprises an anti- $\alpha\beta$ TCR/CD3 scFv and an anti-tumor scFv.

28. A multispecific antibody according to any one of claims 25 to 27, which is bispecific.

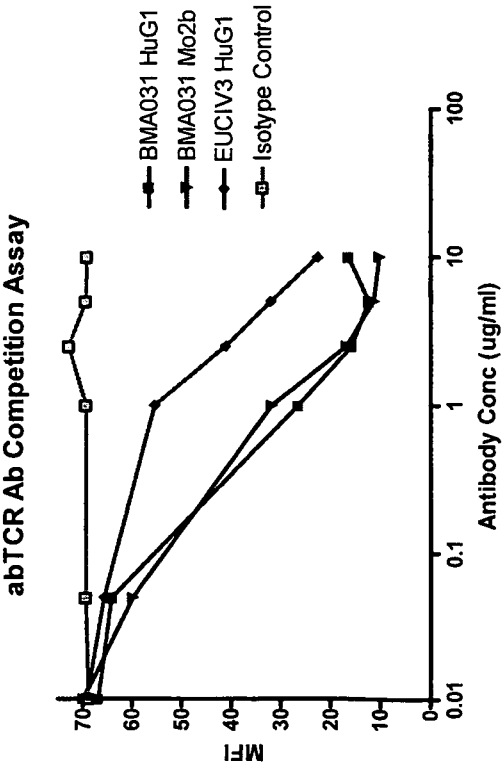


Figure 1

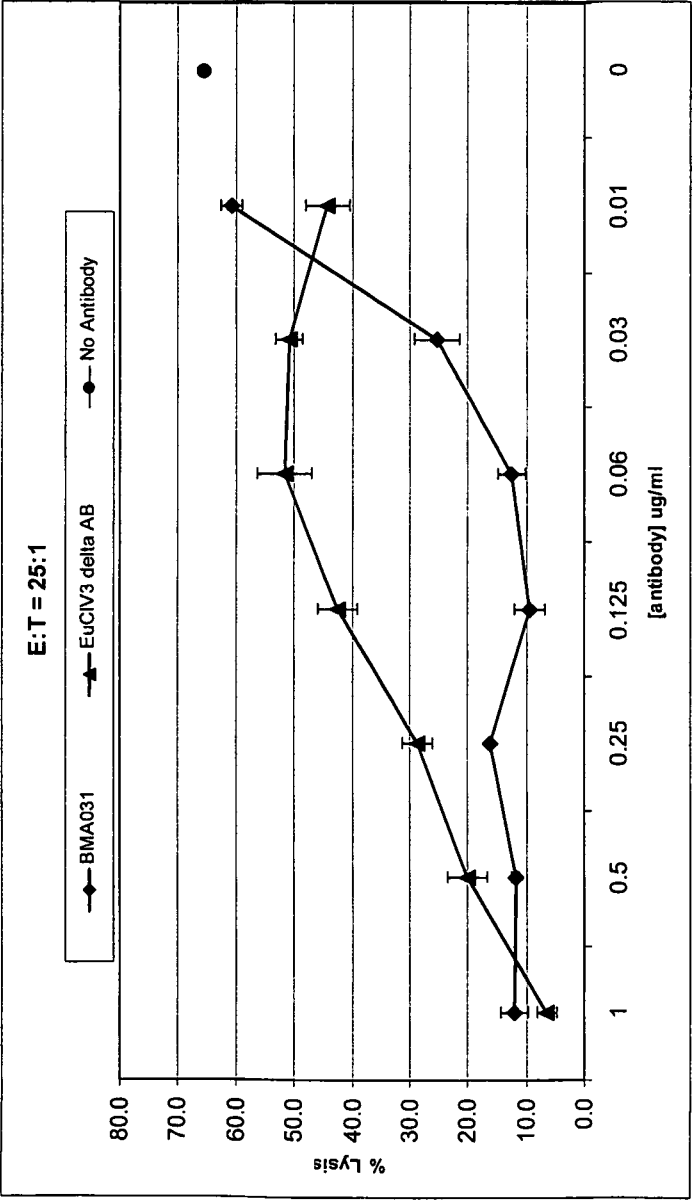


Figure 2

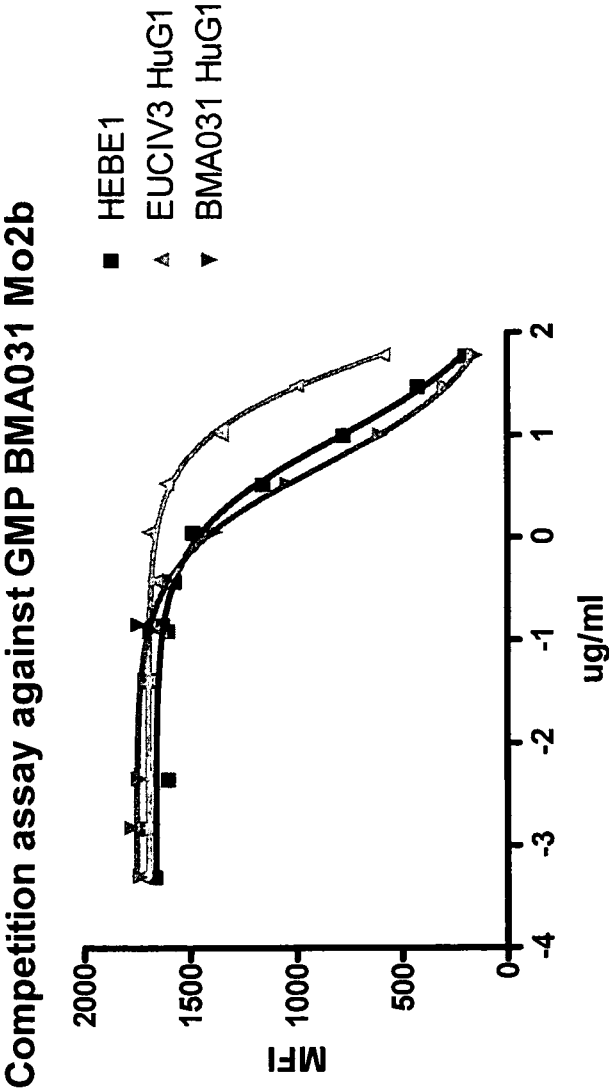


Figure 3

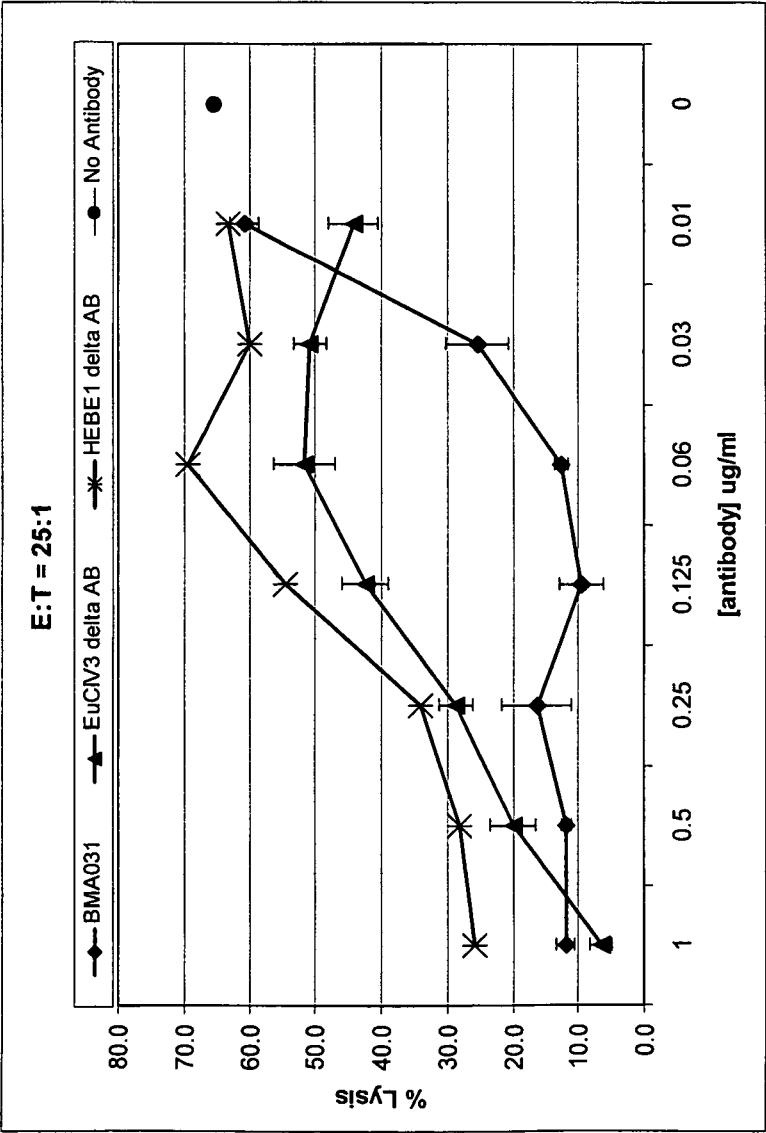


Figure 4

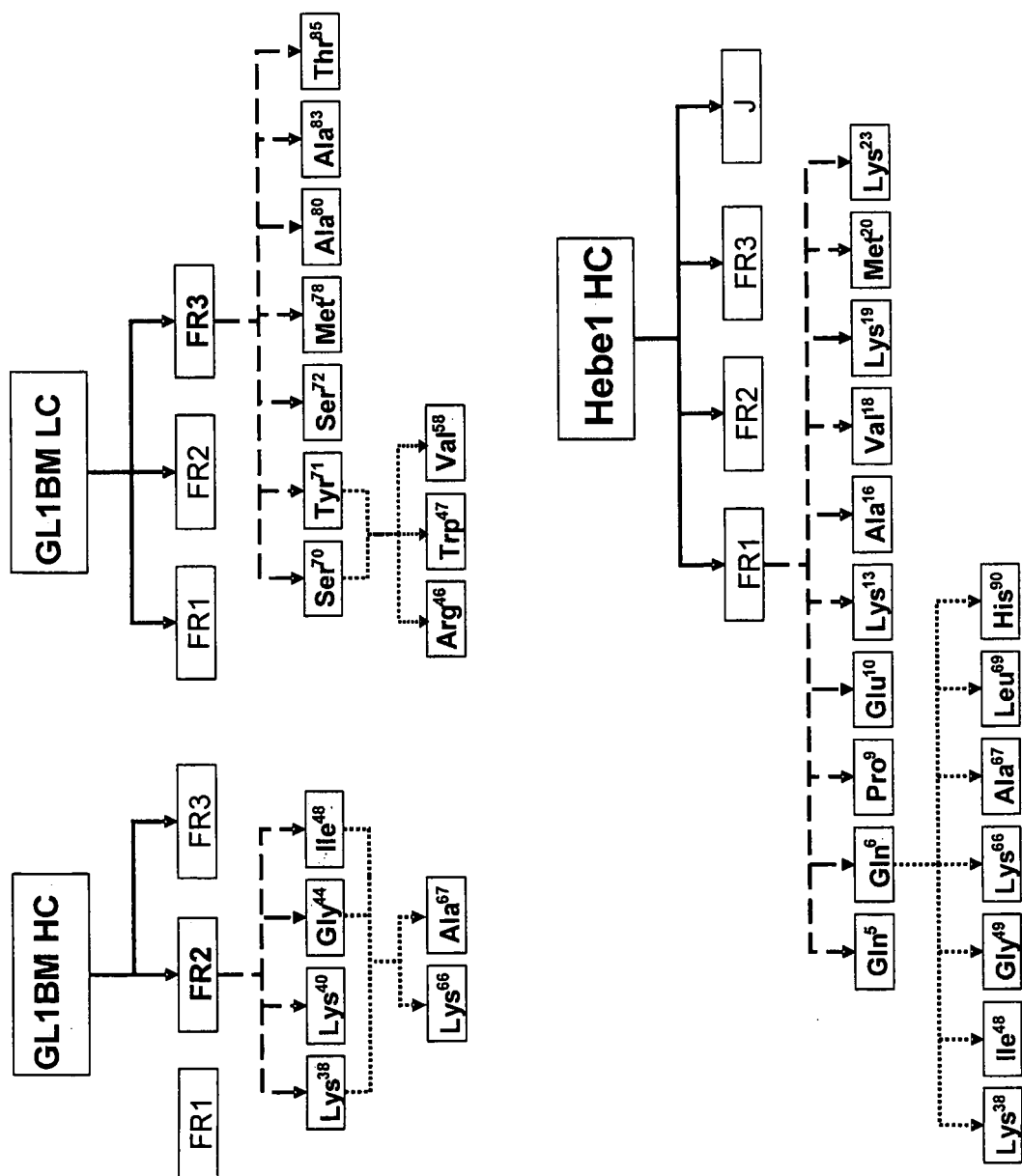


Figure 5

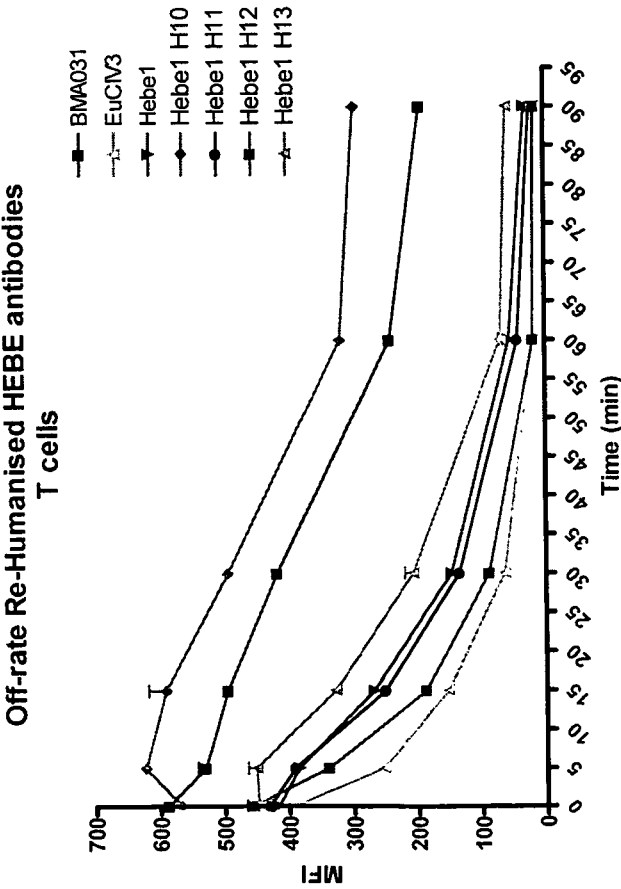


Figure 6

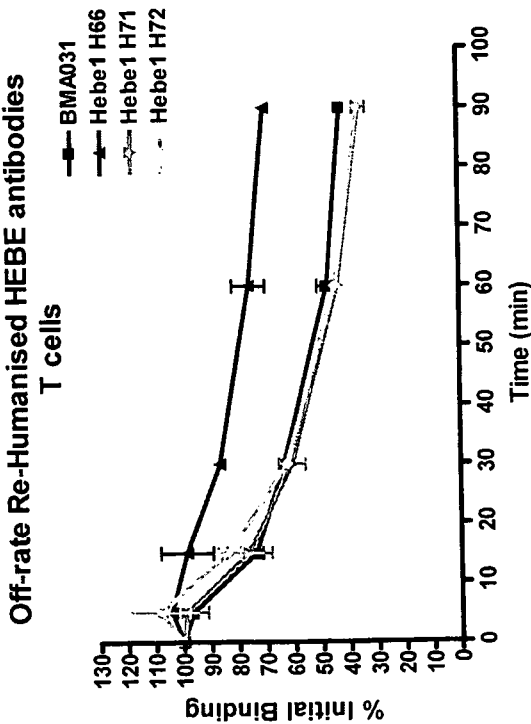


Figure 7

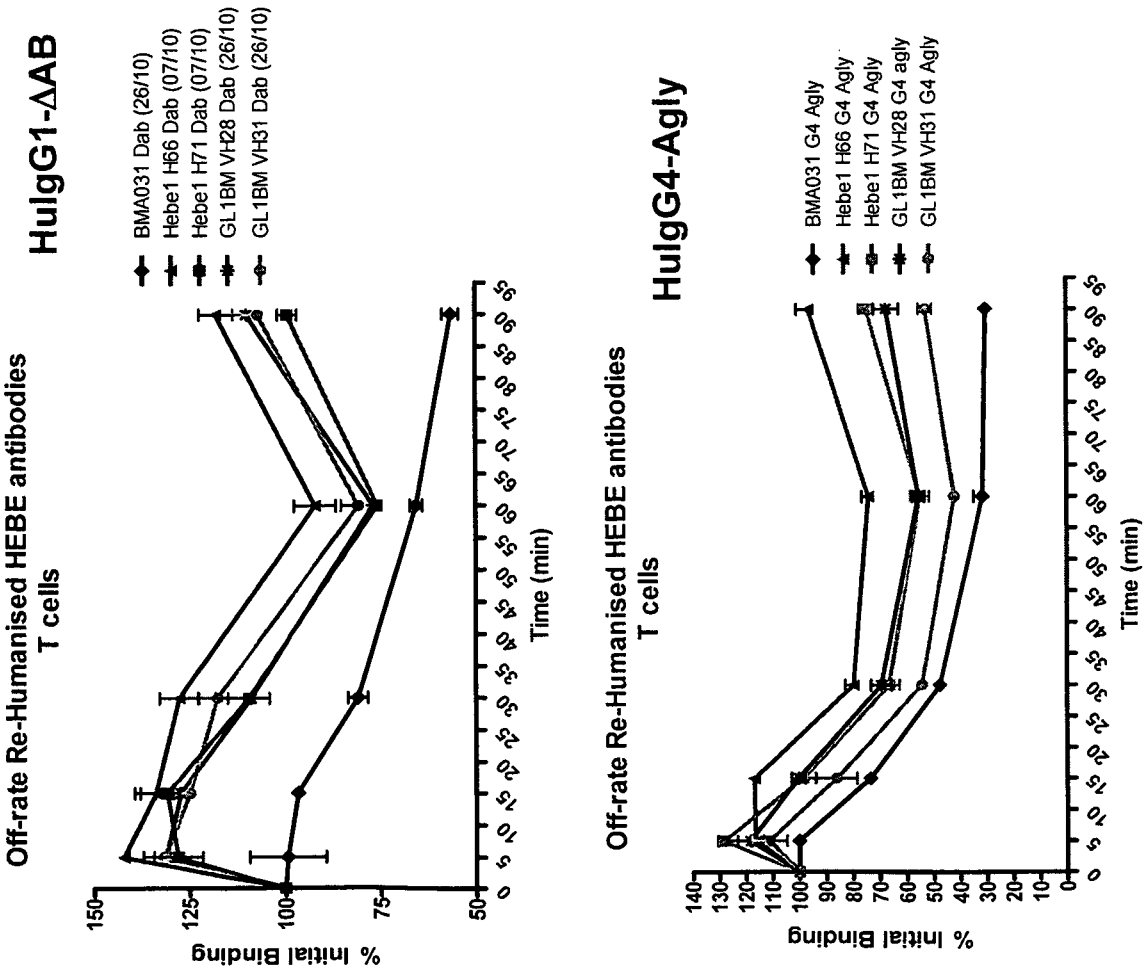


Figure 8

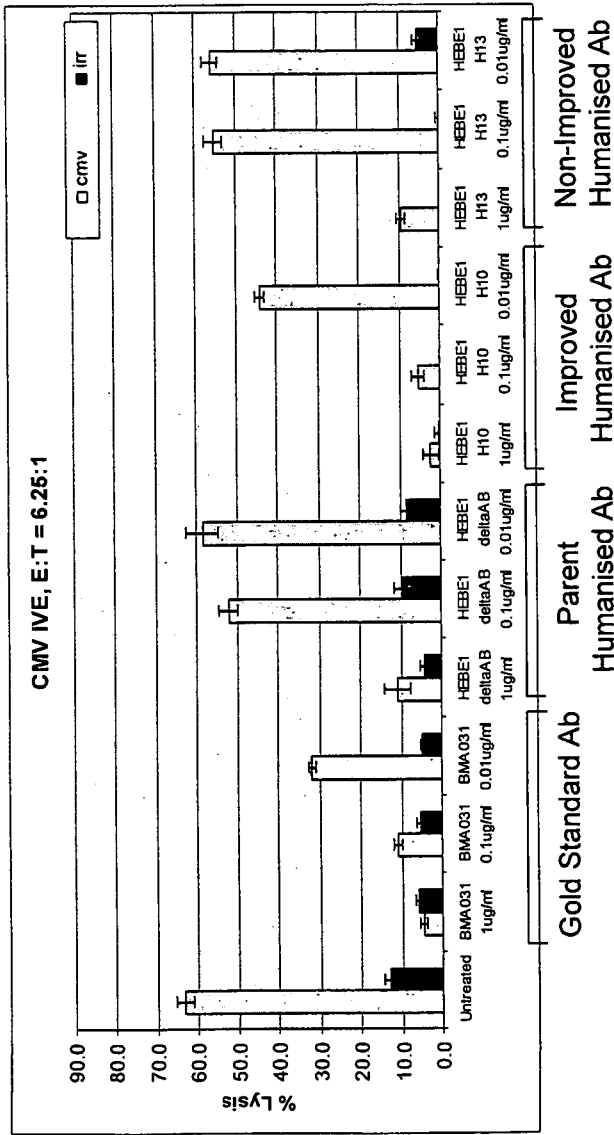


Figure 9

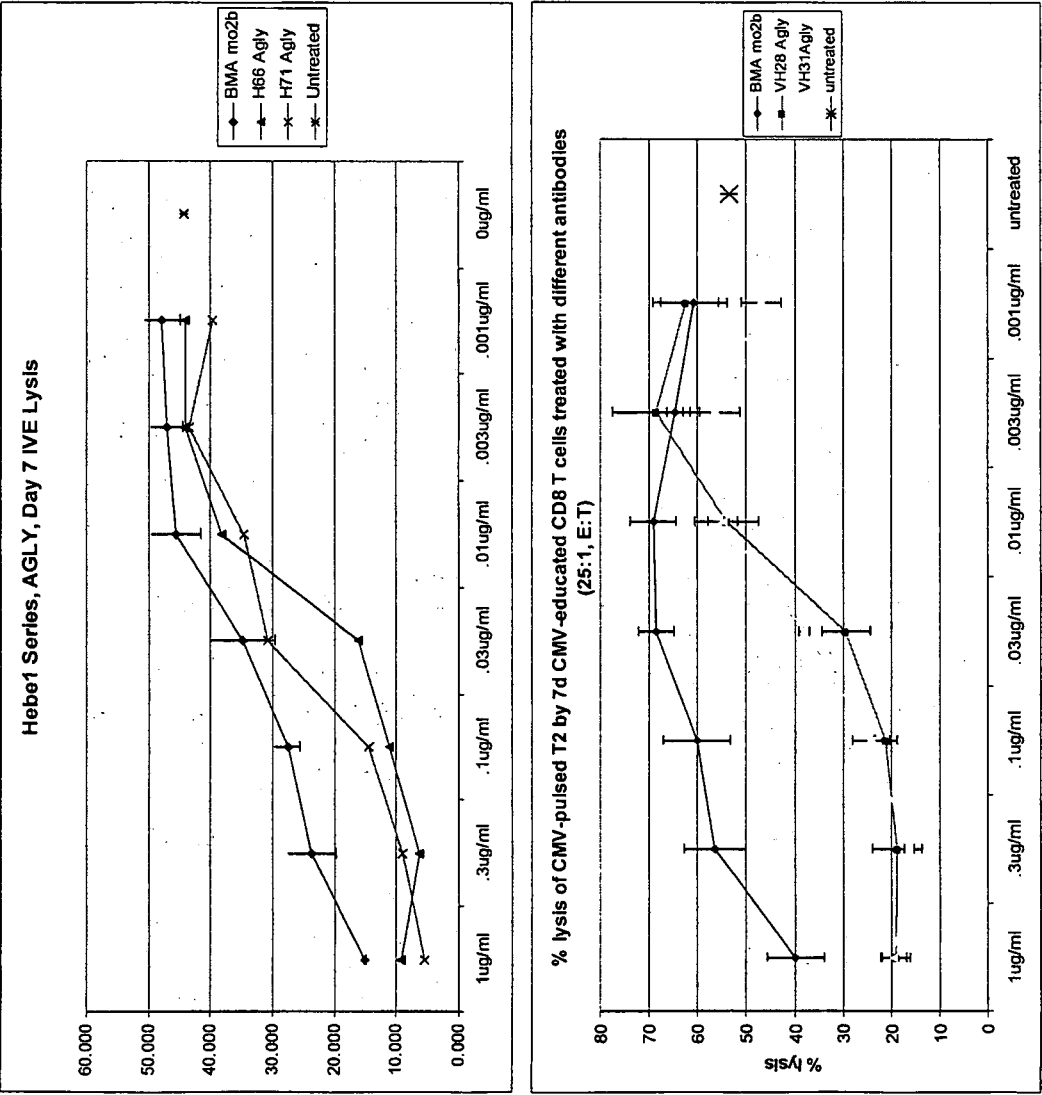


Figure 10

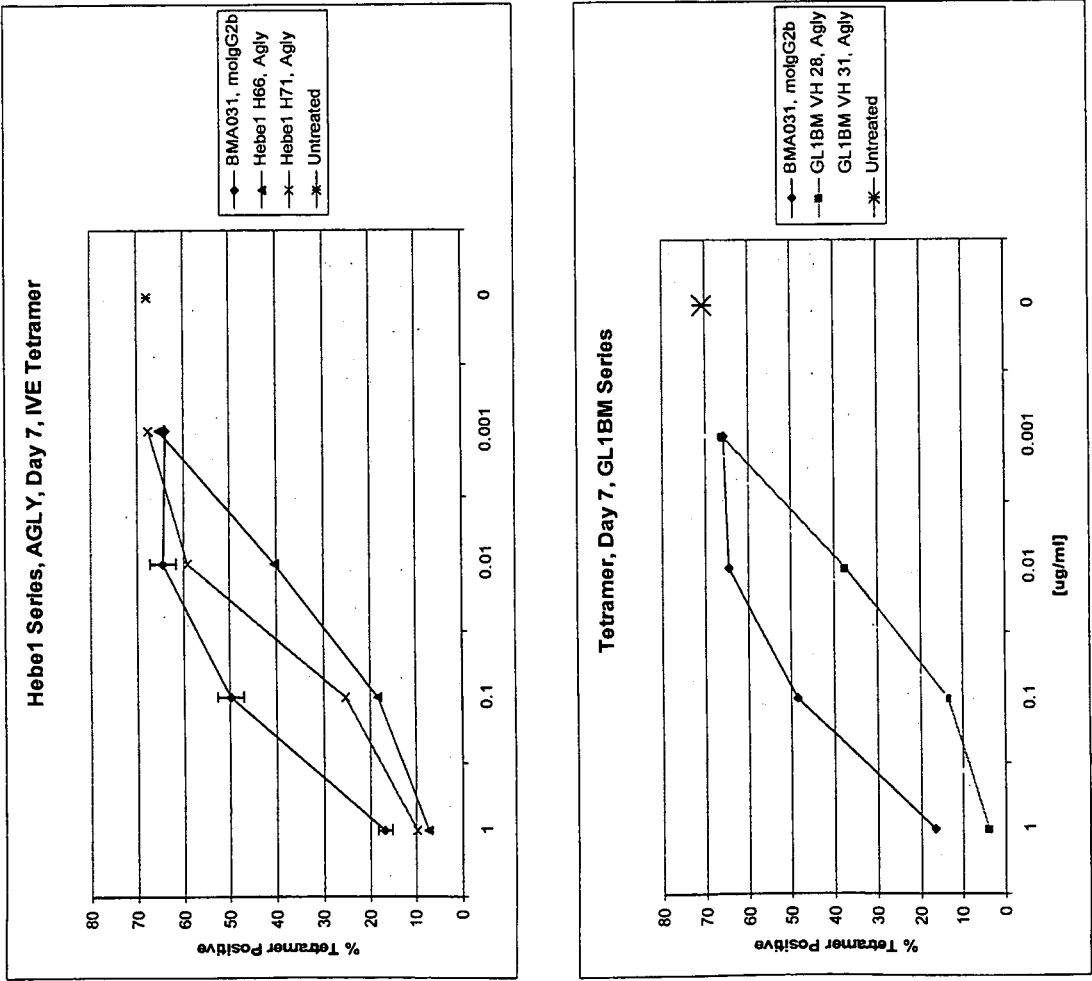


Figure 11

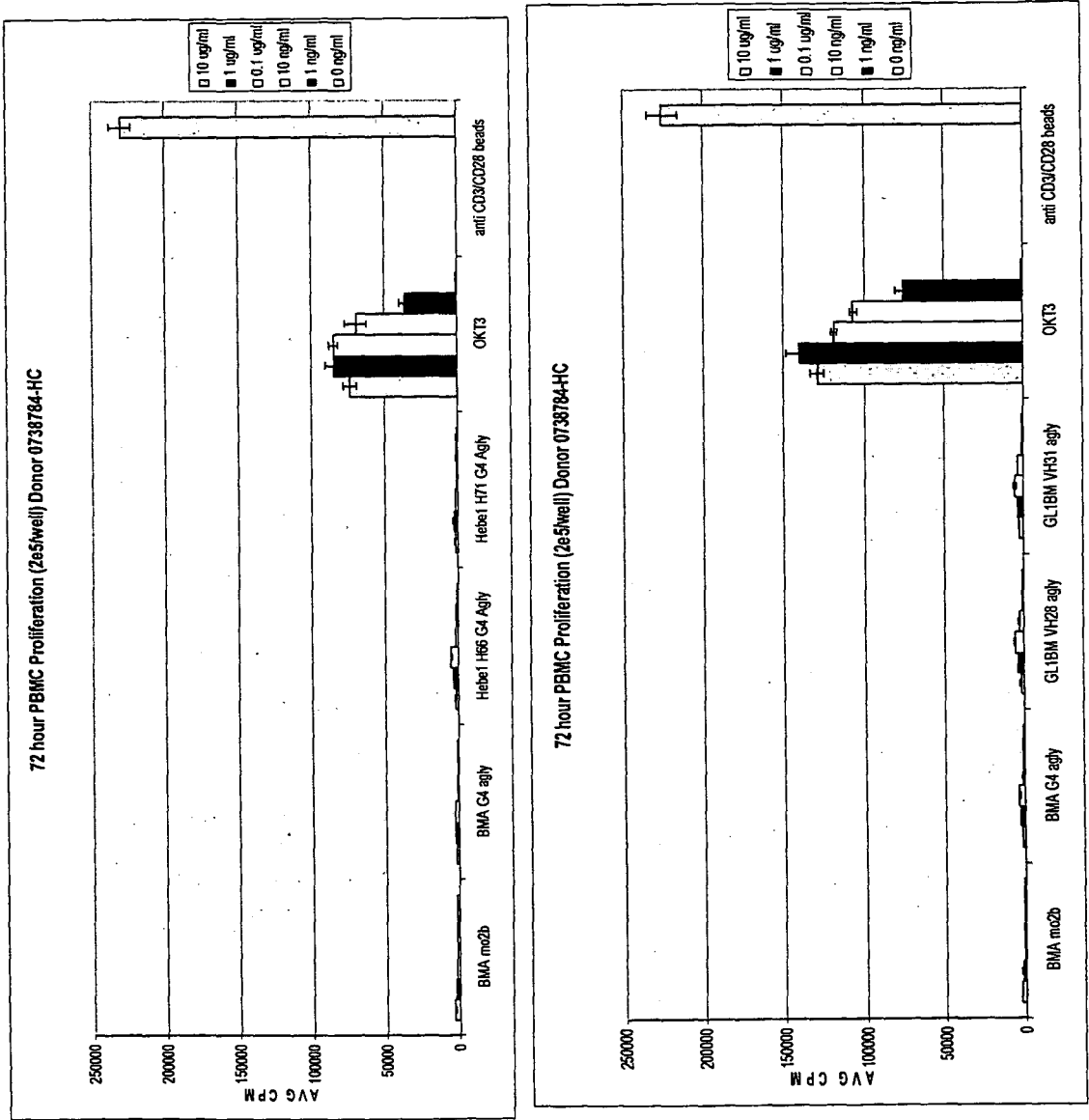


Figure 12

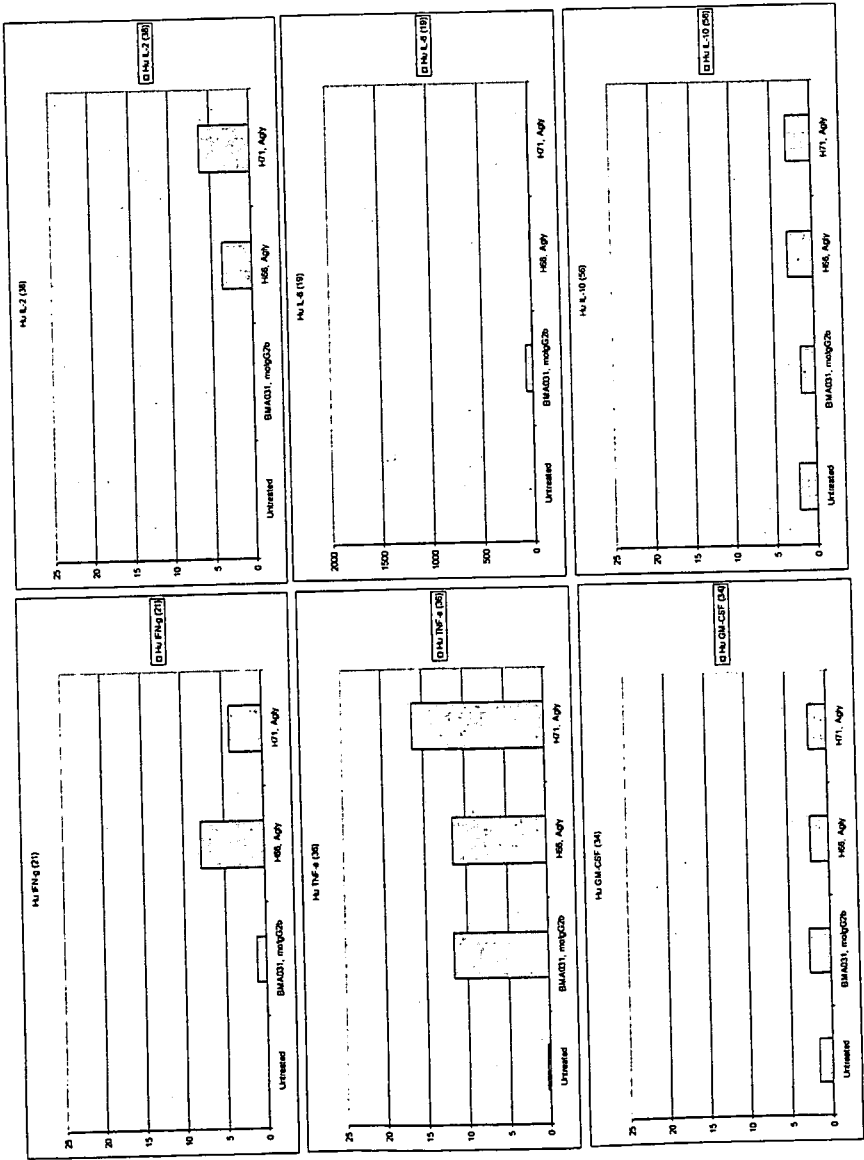


Figure 13

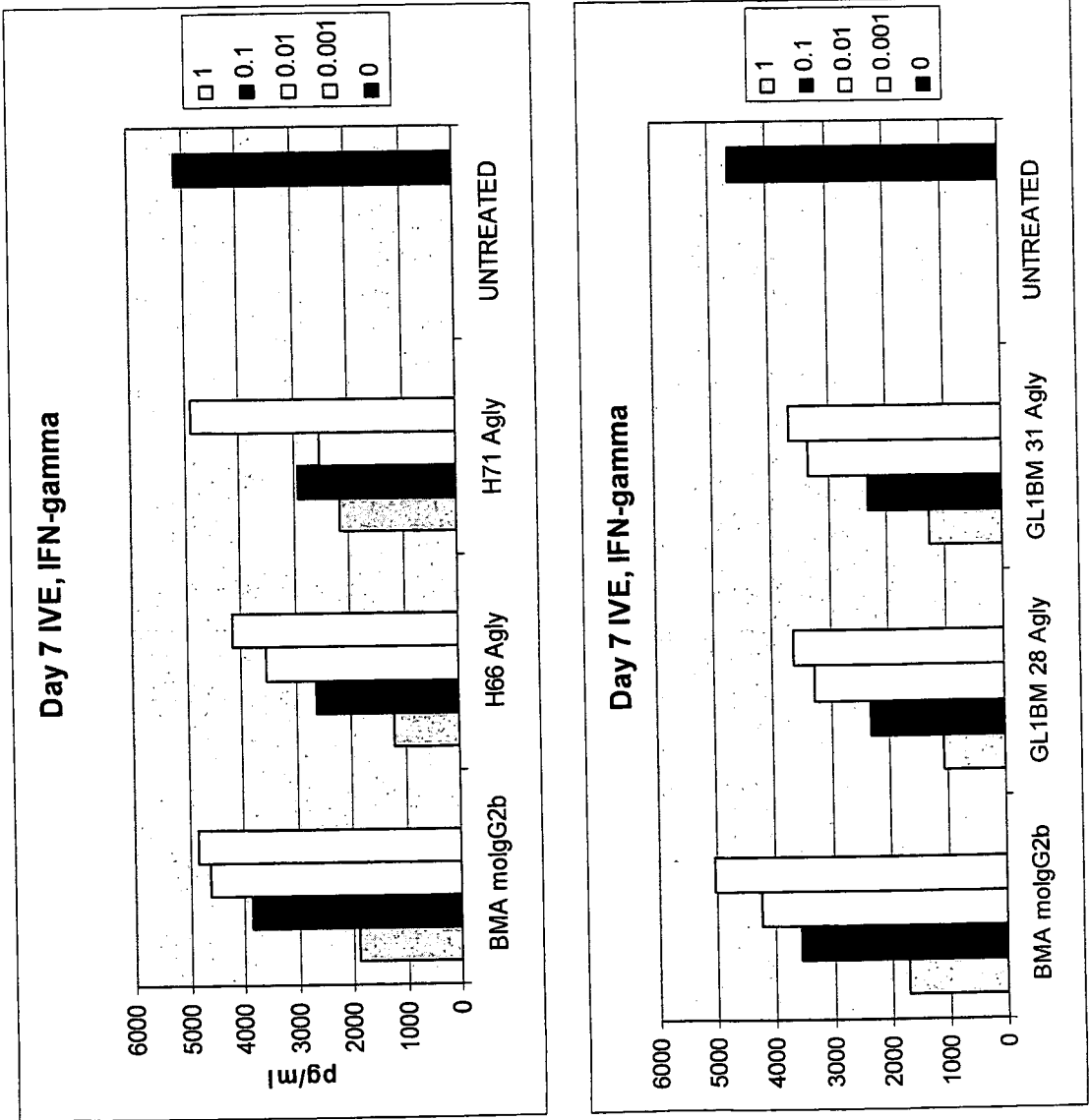


Figure 14

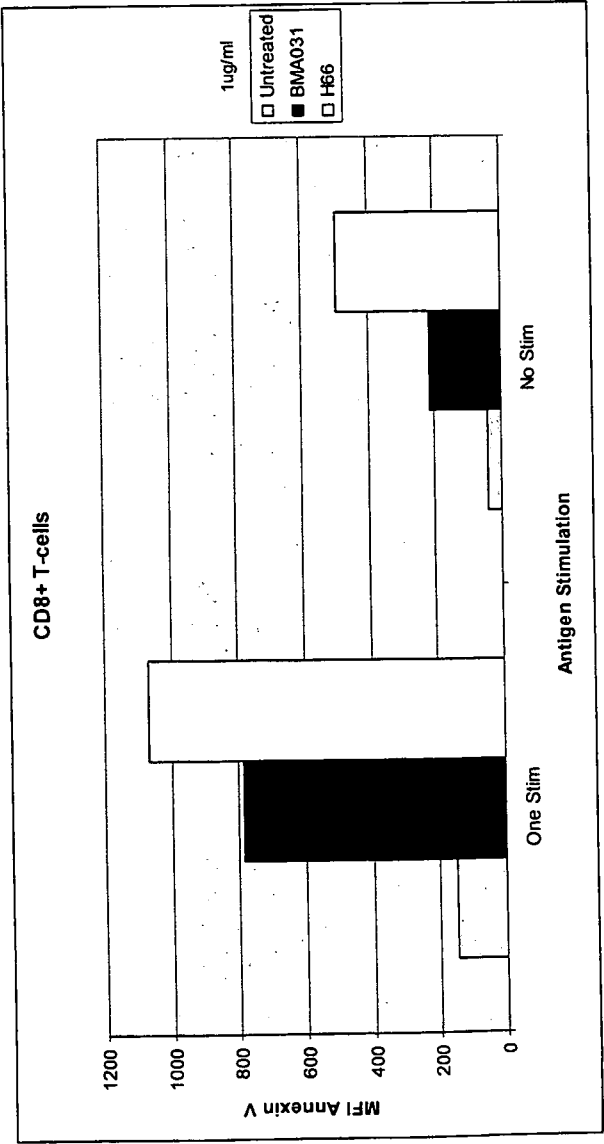


Figure 15

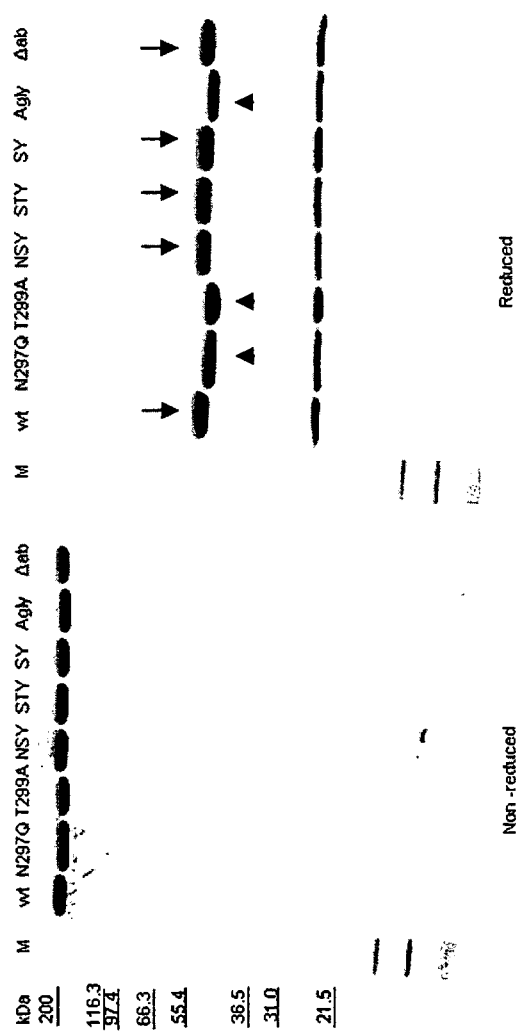
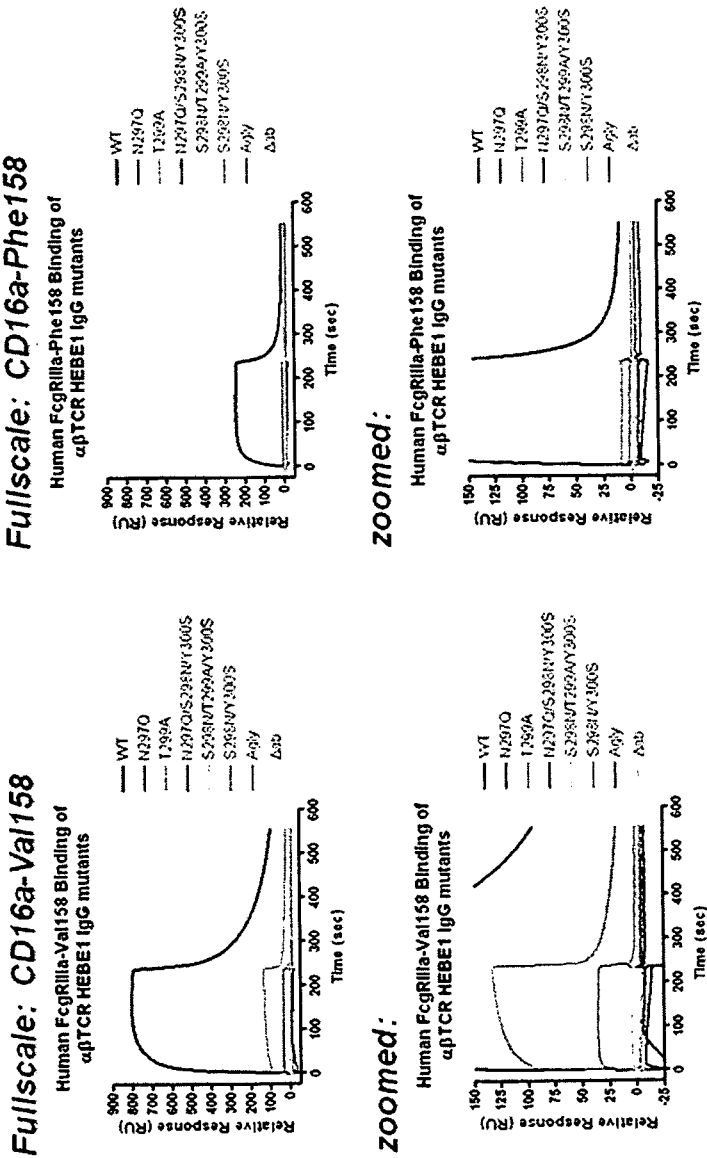


Figure 16

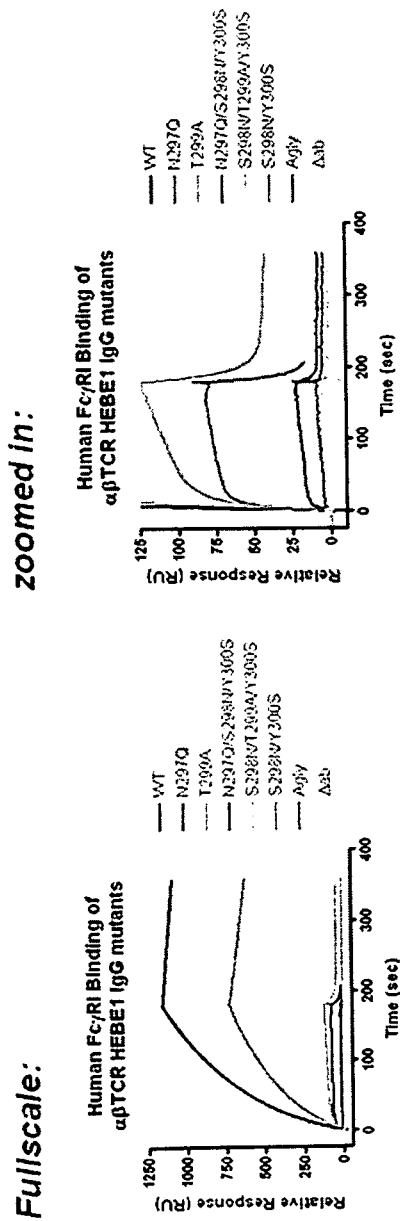
Human FcγRIIIa Binding



○ Very little FcγRIIIa Binding by the mutants, H66 S298N/T299A/Y300S in particular.

Figure 17

Human FcγRI Binding



Very little FcγRI Binding by the mutants, H66 S298N/T299A/Y300S in particular.

Figure 18

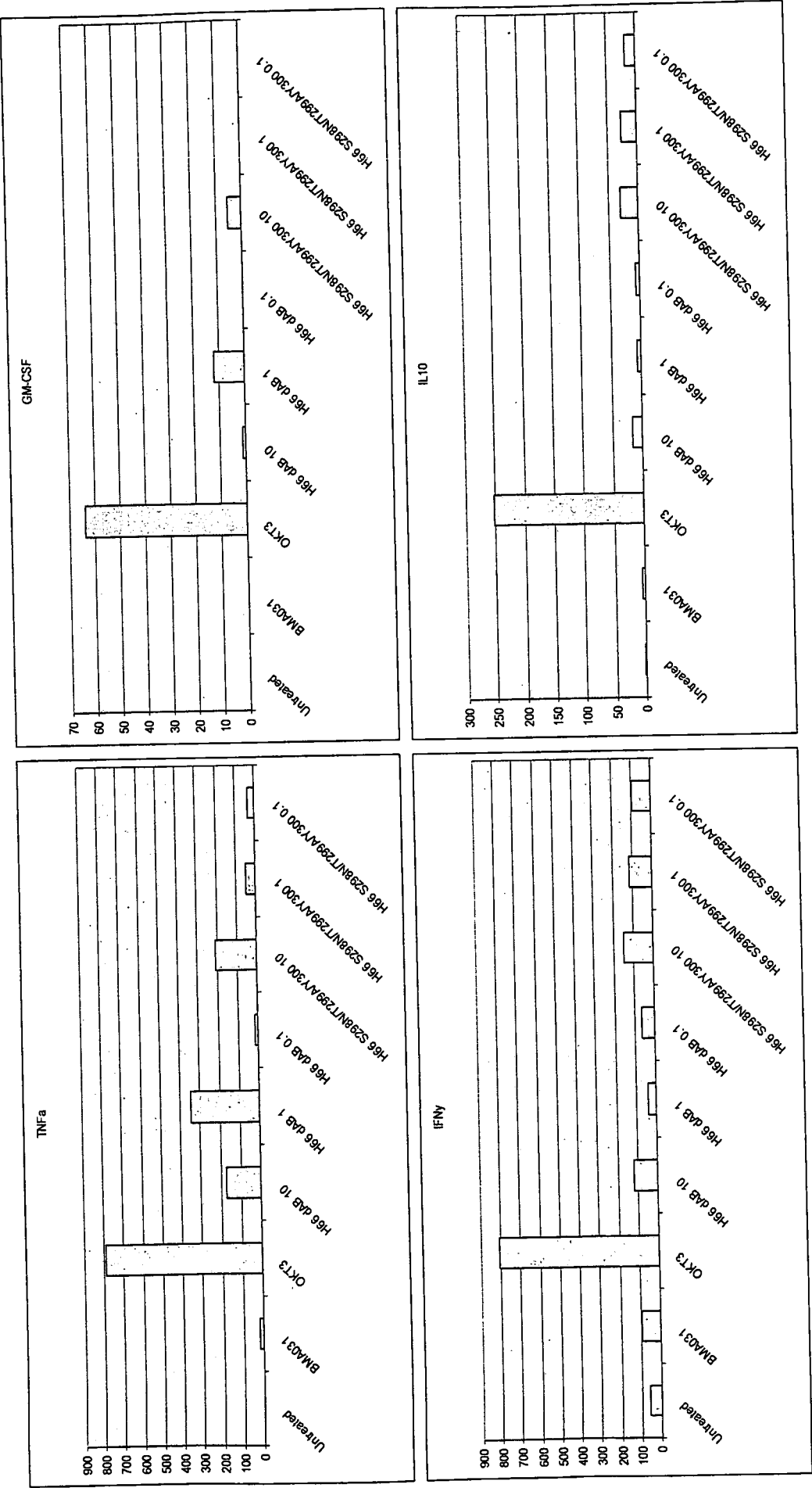


Figure 19

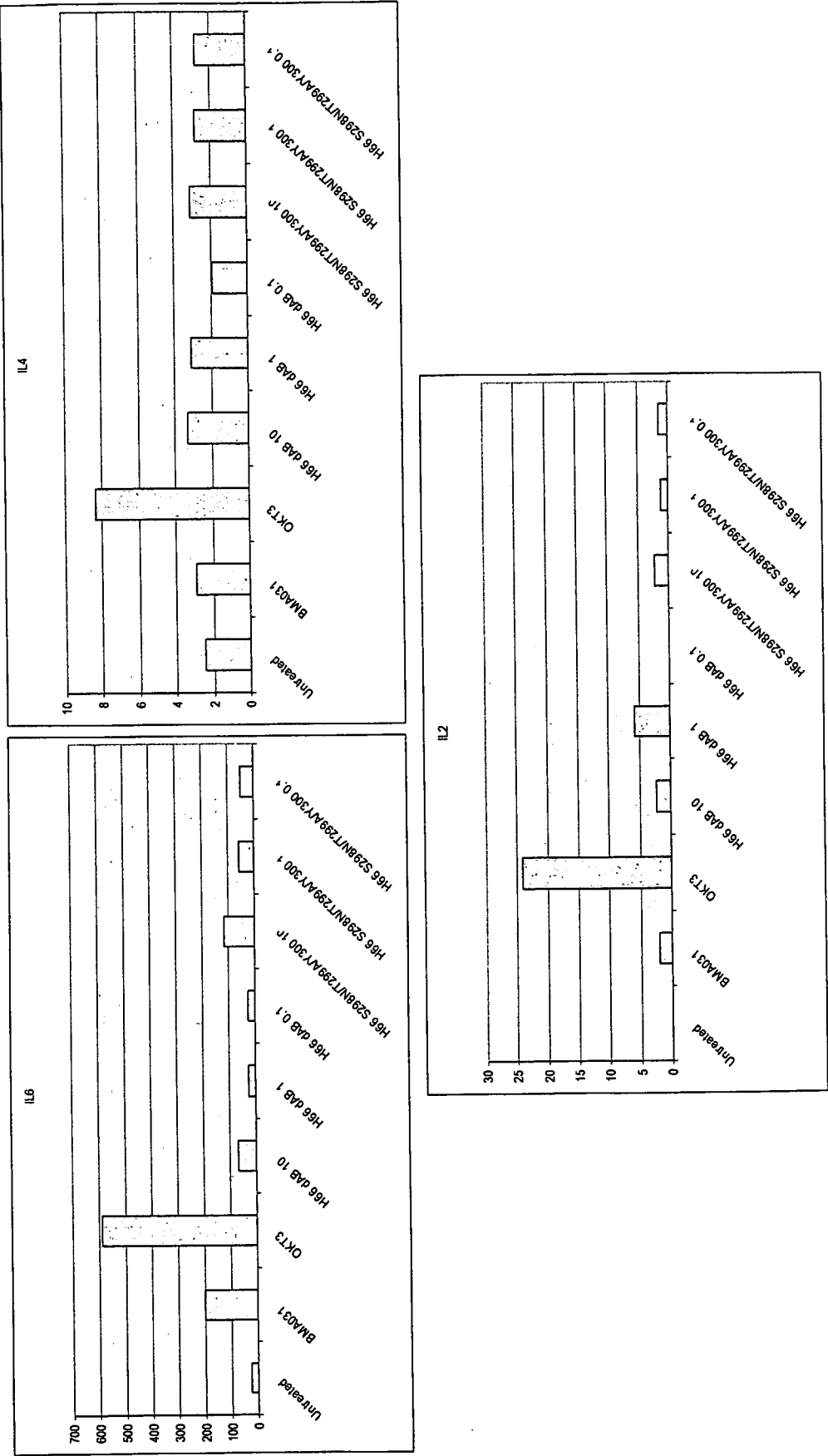


Figure 20

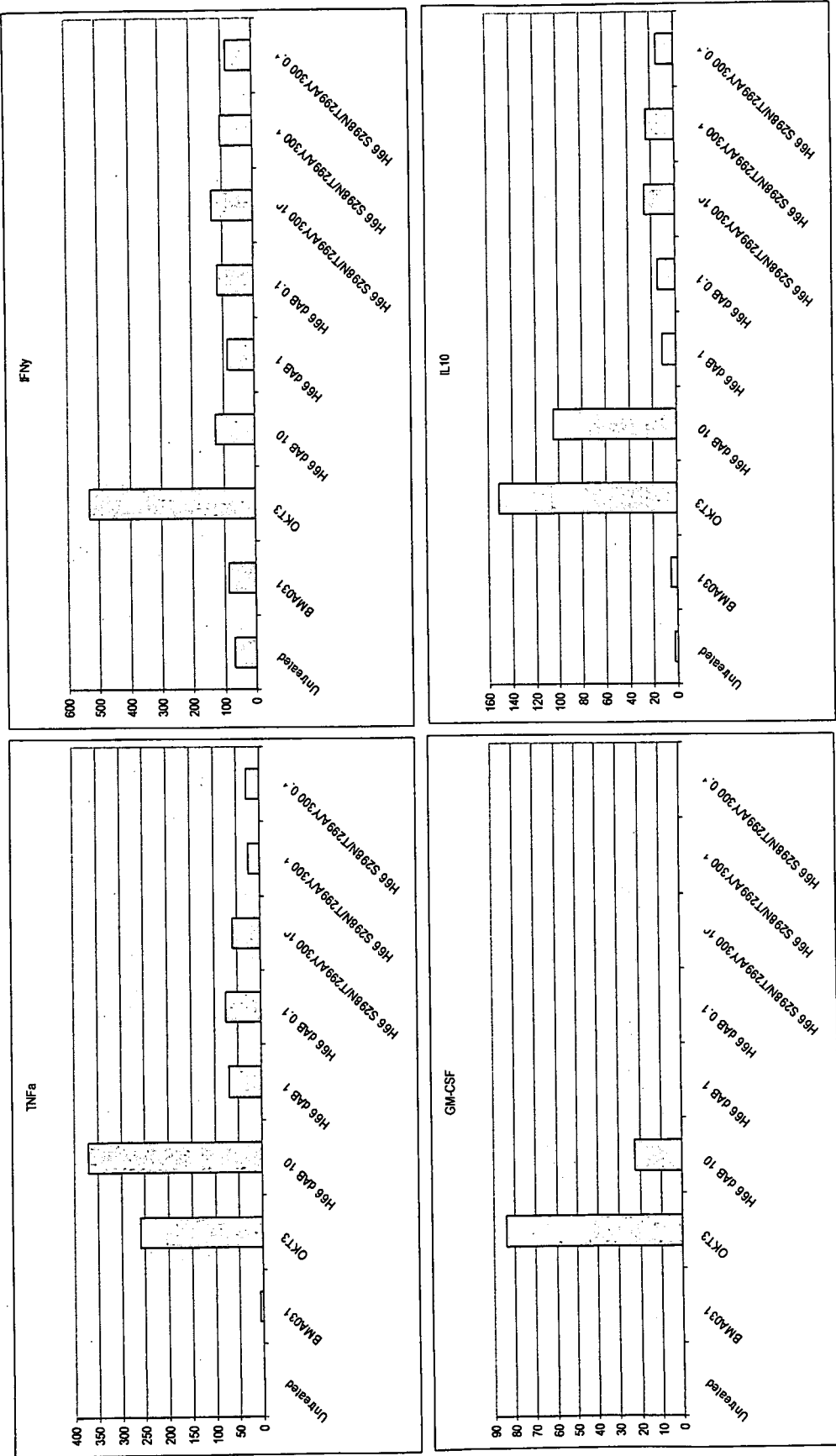


Figure 21

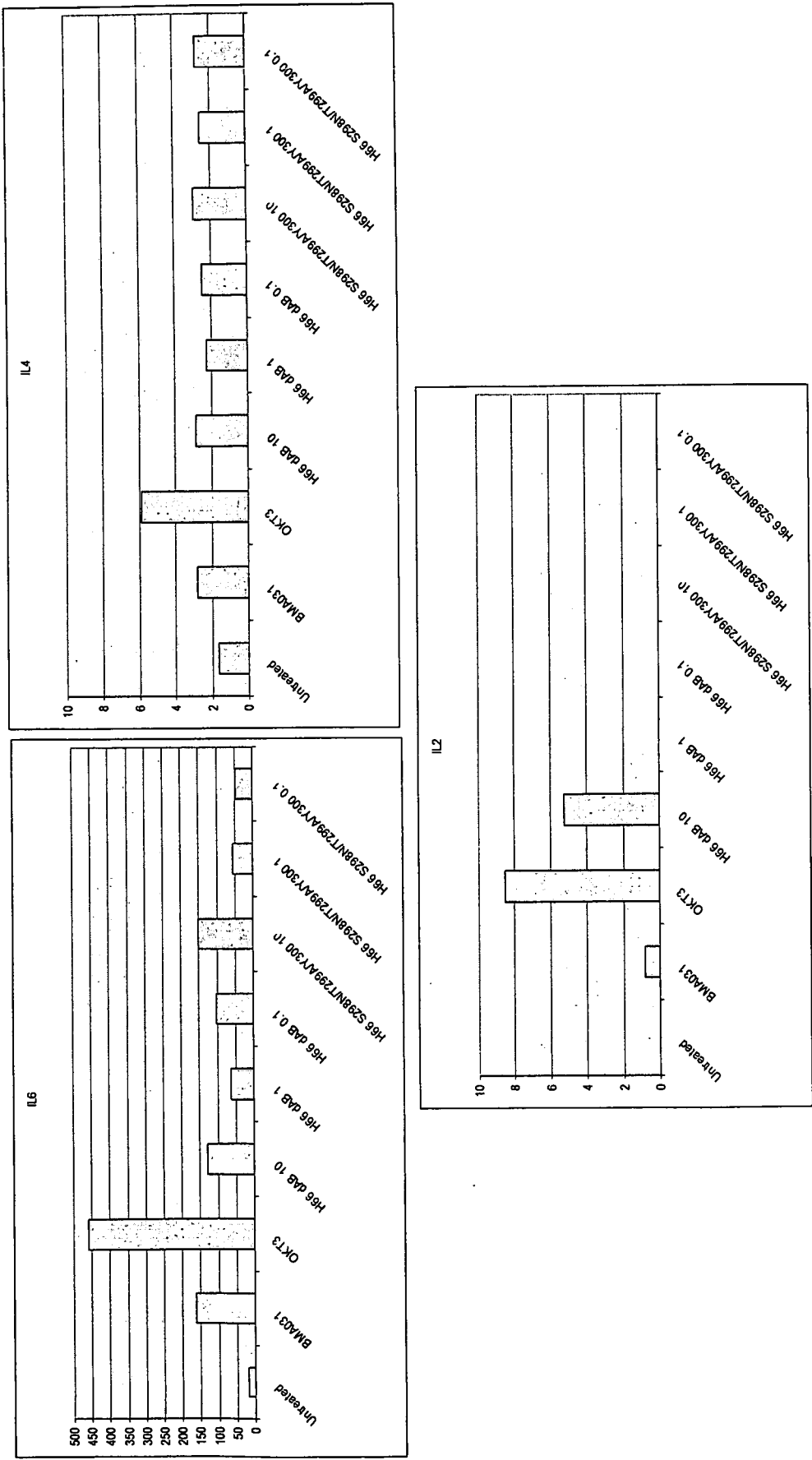


Figure 22

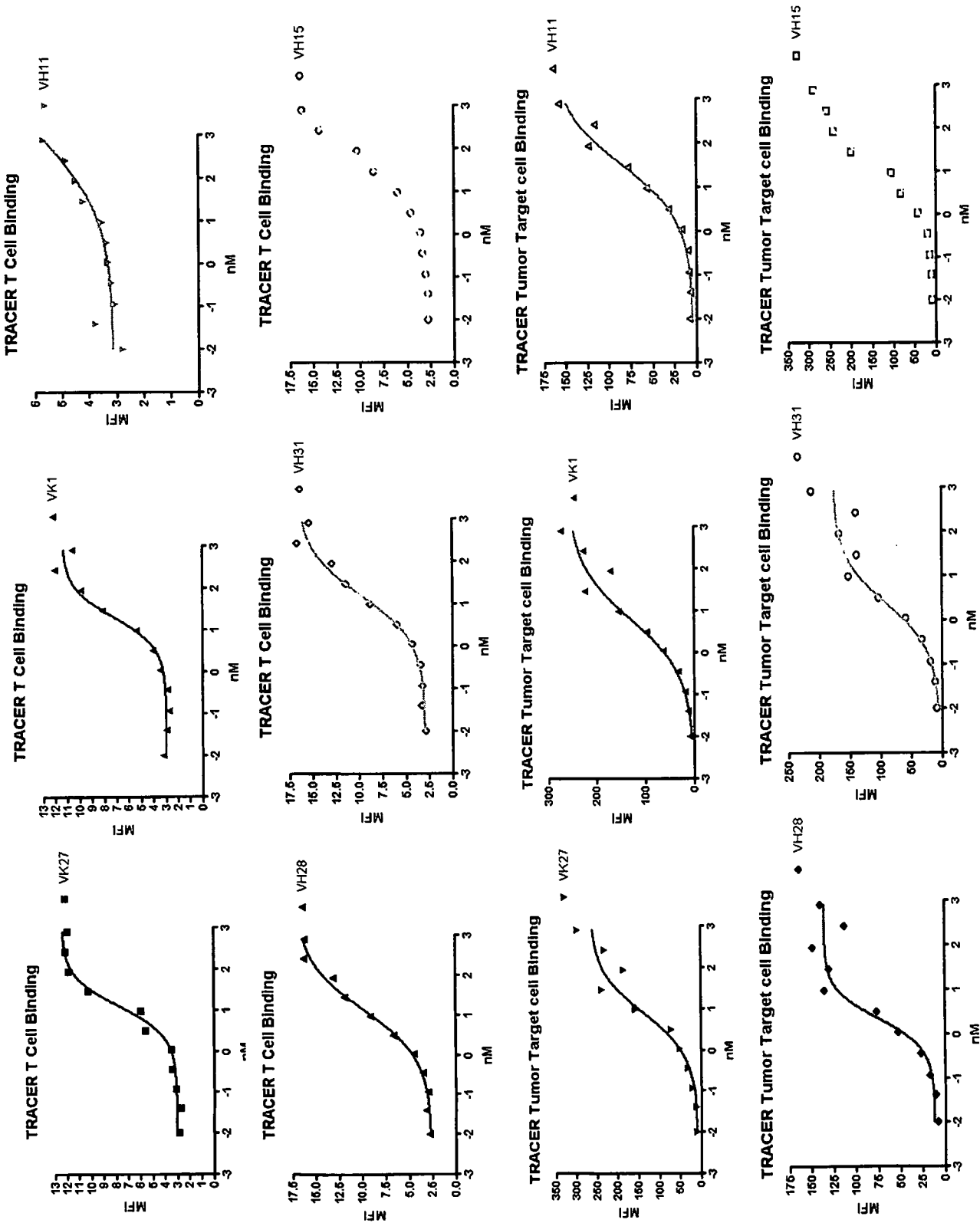


Figure 23

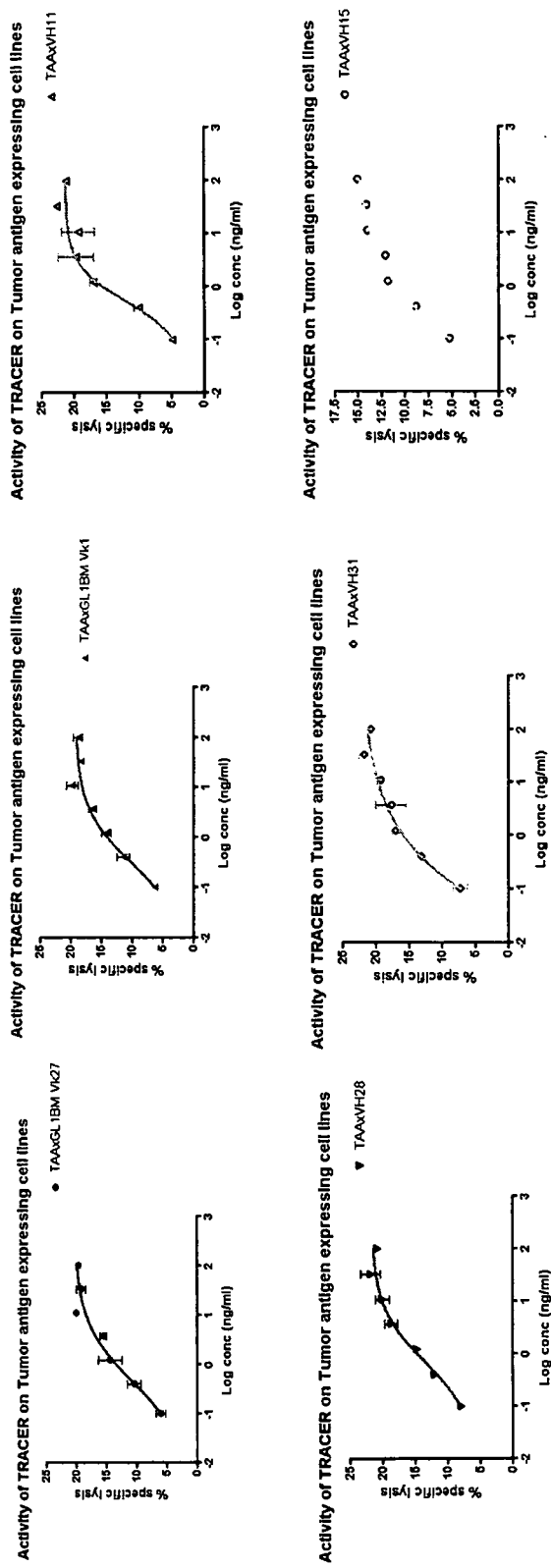


Figure 24

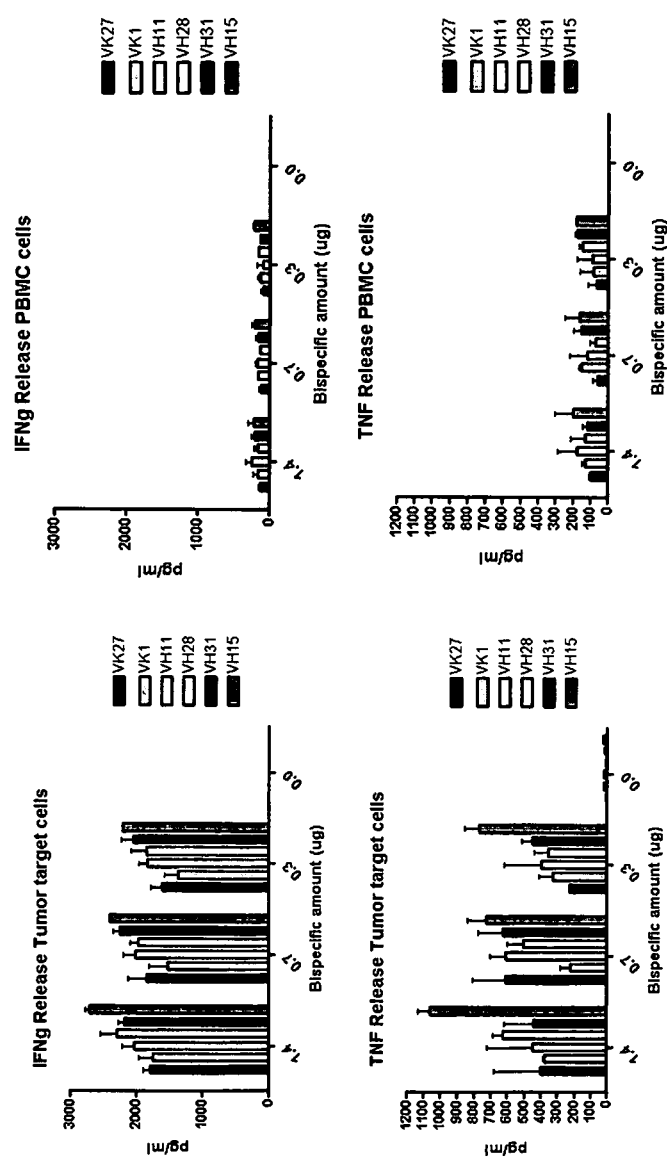
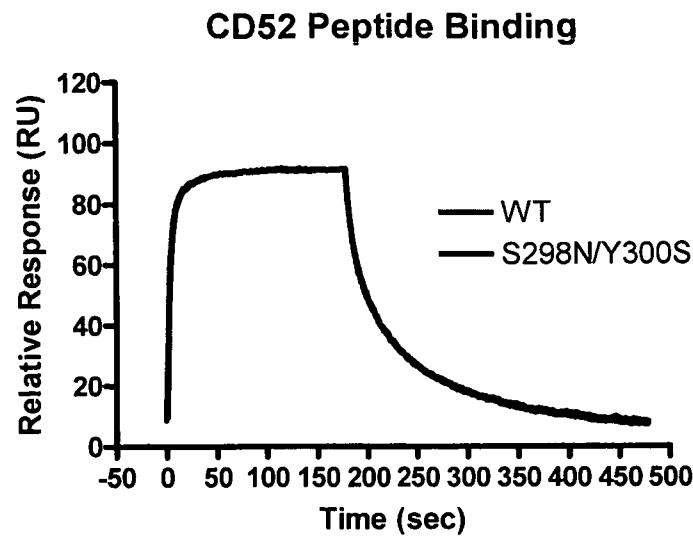
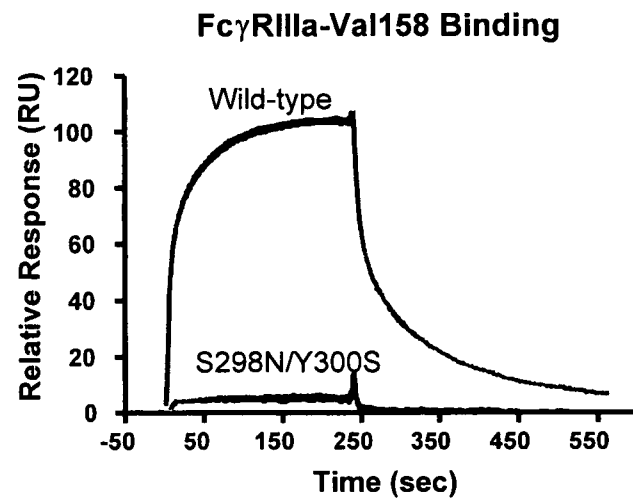


Figure 25

A.



B.



C.

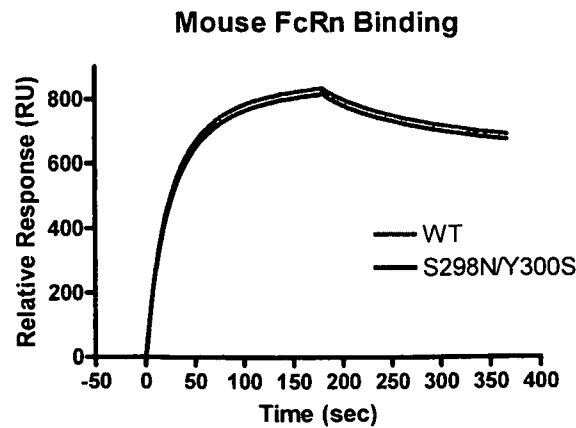


Figure 26

CESIÓN Y ACUERDO

Por el valor recibido y la intención de obligarse legalmente, nosotros, los abajo firmantes inventores conjuntos (Cedentes), vendemos, cedemos y transferimos a Genzyme Corporation (Cesionario), domiciliado en 500 Kendal Street, 02142 Cambridge, EE.UU., y sus sucesores, cesionarios y representantes legales, nuestro derecho exclusivo y entero, título e interés en y con nuestra invención y cualesquiera mejoras de la misma, para todos los países del mundo, relacionada en y con esta aplicación de EE.UU. por lo tanto, Expediente N° 5668USPSP de Sanofi cedida y presentada el 12 de septiembre de 2011, como del expediente N° 61/533,510 y para esta solicitud PCT por lo tanto, Expediente N° 5668W0PCT de Sanofi cedida y presentada el 12 de septiembre de 2012, como número de expediente PCT/EP2012/003819, titulada

ANTICUERPOS ANTI-ALFA BETA

Y todos los derechos y privilegios, incluyendo cualquiera y todos los beneficios de la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, que incluye el derecho a reivindicar la prioridad con base en dicha solicitud de Estados Unidos, y en todos y cada uno de los títulos de patente que se podrán conceder de la misma, y todos los derechos, títulos e intereses sobre y para cada solicitud de patente presentada o que se presente sobre dicha invención en cualquier otro país u organización de patentes, incluyendo, sin limitación, continuaciones, divisiones, renovaciones, reposiciones y todas las solicitudes de sustitución de dicha solicitud de Estados Unidos, y cualquier y todas las patentes que puedan emitir al respecto, y cualesquier reediciones, reexaminaciones, y extensiones, y de exclusividad gubernamental de derechos de la misma; y por la presente autorizamos y solicitamos a la USPTO y cualquier autoridad de patentes u oficina extranjera cuyo deber es la emisión de patentes sobre solicitudes o prioridades como se describe arriba, para emitir todos los títulos de este invento a nombre del cesionario, sus sucesores y cesionarios, de conformidad con los términos de esta cesión.

Afirmamos que somos los inventores originales de la invención reivindicada y autorizamos la presentación de una solicitud de patente para la invención reivindicada.

Autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes la concesión y expedición de cualquier y todas las patentes sobre dicha invención a nombre de dicho cesionario o su sucesor, cesionarios y representantes legales, o para las personas como dicho cesionario pueda indicar.

Estamos de acuerdo en que, cuando se solicite, nosotros, sin cargo a dicho cesionario, sino a su costa, firmaremos todos los papeles, tomaremos todos los juramentos legítimos, testificaremos en cualquier procedimiento legal, y realizaremos todos los actos que puedan ser necesarios, deseables o convenientes para asegurar el mantenimiento, y la ejecución de las patentes de dicha invención en cualquiera y todos los países y para la adquisición de derechos titularidad de los mismos a nombre de dicho cesionario, sus sucesores, cesionarios, representantes legales o personas indicadas.

Convenimos con dicho cesionario, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, que los derechos y los bienes mencionados en el presente documento están libres y exentos de todo gravamen, y que tenemos derecho para transmitir el mismo que en el presente documento se expresa y que no vamos a realizar cualquier cesión, contrato, o entendimiento que se oponga.

Por la presente, reconocemos que las declaraciones falsas intencionales hechas en esta cesión se castigan con multa o encarcelamiento, o ambos, bajo el Título 18, de Estados Unidos código § 1001.

Firmado en Zúrich, Suiza el 18 de febrero de 2014

Firma: Ilegible

Nombre del Inventor: Daniel SNELL

Dirección de correspondencia: Im Sunnebuel, 8, Thalwill 8800, Suiza

Presenciado por:

Firma: Ilegible

Nombre: Ignacio Dolado

Firma: Ilegible

Nombre: Steiner Daniel

Firmado en Oslo, Noruega el 25 de febrero de 2014

Firma: Ilegible

Nombre del Inventor: Andreas MENRAD

Dirección de correspondencia: Allerstrasse 7, 16515 Oranienburg, Alemania

Presenciado por:

Firma: Ilegible

Nombre: Alan S Cuthbertson

Firma: Ilegible

Nombre: Adam O'Shea

Firmado en Framingham, Massachusetts, Estados Unidos el 18 de febrero de 2014

Firma: Ilegible

Nombre del Inventor: Gina LACORCIA

Dirección de correspondencia: Bridgewater, New Jersey, 08807, Estados Unidos

Presenciado por:

Firma: Ilegible

Nombre: Carla Lawendowski

Firma: Ilegible

Nombre: Jean S. Cavallo

Firmado en Framingham, el 18 de febrero de 2014

Firma: Ilegible

Nombre del Inventor: Srinivas SHANKARA

Dirección de correspondencia: Bridgewater, New Jersey, 08807, Estados Unidos

Presenciado por:

Firma: Ilegible

Nombre: Deepak Griver

Firma: Ilegible

Nombre: Matthew Davison

Firmado en Framingham, Massachusetts, Estados Unidos el 21 de febrero de 2014

Firma: Ilegible

Nombre del Inventor: Huawei QIU

Dirección de correspondencia: Bridgewater, New Jersey, 08807, Estados Unidos

Presenciado por:

Firma: Ilegible

Nombre: Denise Honey

Firma: Ilegible

Nombre: Julie J. Bird

Firmado en Framingham, Massachusetts, Estados Unidos el 21 de febrero de 2014

Firma: Ilegible

Nombre del Inventor: Clark PAN

Dirección de correspondencia: Bridgewater, New Jersey, 08807, Estados Unidos

Presenciado por:

Firma: Ilegible

Nombre: Denise Honey

Firma: Ilegible

Nombre: Julie J. Bird

Firmado en Zúrich, Suiza el 24 de febrero de 2014

Firma: Ilegible

Nombre del Inventor: Benjamin KEBBLE

Dirección de correspondencia: Frelestrasse 94, Zúrich, 8032, Suiza

Presenciado por:

Firma: Ilegible

Nombre: Julia Hepp

Firma: Ilegible

Nombre: Caroline Johnson-Leger

ASSIGNMENT AND AGREEMENT

FOR VALUE RECEIVED and intending to be legally bound, we, the undersigned joint inventors (Assignors), sell, assign and transfer to **GENZYME CORPORATION** (Assignee), **500 Kendall Street, 02142 Cambridge, USA**, and its successors, assigns and legal representatives, our entire and exclusive right, title and interest in and to our invention and any improvements thereon for all countries of the world, relating in and to this U.S. application therefore, assigned Sanofi Docket No. **5668USPSP** filed on **September 12, 2011**, as Serial No. **61/533,510** and to this PCT application therefore, assigned Sanofi Docket No. **5668WOPCT** filed on **September 12, 2012**, as Serial No. **PCT/EP2012/003819**, entitled

ANTI-ALPHA BETA TCR ANTIBODIES

and all the rights and privileges, including any and all benefits under the International Convention for the Protection of Industrial Property, including the right to claim priority based on said United States application, and under any and all Letters Patent which may be granted therefor, and all right, title and interest in and to every patent application filed or to be filed on said invention in any other country or patent organization, including, without limitation, continuations, divisions, renewals, revivals, and any substitute applications of said United States application, and any and all patents which may issue thereon, and any reissues, reexaminations, pipelines and extensions, and governmental exclusivity rights of the same; and we hereby authorize and request the USPTO and any foreign patent authority or office whose duty it is to issue patents on applications or priorities as described above, to issue all Letters Patent for this invention to Assignee, its successors and assigns, in accordance with the terms of this Assignment.

WE state that we are original inventors of the claimed invention and authorize the filing of a patent application for the claimed invention.

WE authorize and request competent authorities to grant and issue any and all patents on said invention to said assignee or its successor, assigns and legal representatives, or to such nominees as said assignee may designate.

WE agree that, when requested, we will, without charge to said assignee but at its expense, sign all papers, take all rightful oaths, testify in any legal proceedings, and do all acts which may be necessary, desirable or convenient for securing, maintaining, and enforcing patents for said invention in any and all countries and for vesting title thereto in said assignee, its successors, assigns, legal representatives or nominees.

WE covenant with said assignee, its successors, assigns and legal representatives, that the rights and property herein conveyed are free and clear of any encumbrance, and that we have full right to convey the same as herein expressed and that we will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

WE hereby acknowledge that any willful false statements made in this assignment are punishable by fine or imprisonment, or both, under Title 18, United States code §1001.

Signed at ZÜRICH, SWITZERLAND on this 18TH day of FEBRUARY, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Mailing Address:

Daniel SNELL

Im Sunnebuél 8, Thalwil 8800, Switzerland

Witnessed by: _____

Signature

Print Name: IGNACIO DOLADO

Witnessed by: _____

Signature

Print Name: Steiner Daniel

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Mailing Address:

Andreas MENRAD

Allerstrasse 7, 16515 Oranienburg, Germany

Witnessed by: _____

Witnessed by: _____

Signature

Print Name:

Signature

Print Name:

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Mailing Address:

Gina LACORCIA

Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by: _____

Witnessed by: _____

Signature

Print Name:

Signature

Print Name:

WE hereby acknowledge that any willful false statements made in this assignment are punishable by fine or imprisonment, or both, under Title 18, United States code §1001.

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Daniel SNELL

Mailing Address:

Im Sunnebuel 8, Thalwil 8800, Switzerland

Witnessed by: _____

Witnessed by: _____

Signature _____

Print Name: _____

Signature _____

Print Name: _____

Signed at Oslo, Norway on this 25 day of February, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Andreas MENRAD

Mailing Address:

Allerstrasse 7, 16515 Oranienburg, Germany

Witnessed by: _____

Witnessed by: _____

Signature _____

Print Name:

ALAN S CUTHERBERTSON

Signature _____

Print Name:

Adam O'Shea

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Gina LACORCIA

Mailing Address:

Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by: _____

Witnessed by: _____

Signature _____

Print Name:

Signature _____

Print Name:

WE hereby acknowledge that any willful false statements made in this assignment are punishable by fine or imprisonment, or both, under Title 18, United States code §1001.

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Daniel SNELL

Mailing Address:

Im Sunnebuel 8, Thalwil 8800, Switzerland

Witnessed by: _____

Witnessed by: _____

Signature _____

Print Name: _____

Signature _____

Print Name: _____

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Andreas MENRAD

Mailing Address:

Allerstrasse 7, 16515 Oranienburg, Germany

Witnessed by: _____

Witnessed by: _____

Signature _____

Print Name: _____

Signature _____

Print Name: _____

Signed at Framingham, MA USA on this 18 day of Feb., 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____

Inventor's Name:

Gina LACORCIA

Mailing Address:

Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by: _____

Signature _____

Print Name:

Carla Lawendowski

Witnessed by: _____

Signature _____

Print Name:

Sean S. Cavallo

Signed at Framingham on this 12th day of February, 2014
(City, State and Nation)

Signature:

Inventor's Name:

Mailing Address:

S. Srinivas
Srinivas SHANKARA
Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by:

Deepak Gower
Signature
Print Name: Deep

Witnessed by:

Matthew Davison
Signature
Print Name: MATTHEW DAVISON

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature:

Inventor's Name:

Mailing Address:

Huawei QIU
Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by:

Signature
Print Name:

Signature
Print Name:

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature:

Inventor's Name:

Mailing Address:

Clark PAN
Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by:

Witnessed by:

Signature
Print Name:

Signature
Print Name:

Signed at _____ on this _____ day of _____, 2014
(City, State and Nation)

Signature: _____
Inventor's Name: Srinivas SHANKARA
Mailing Address: Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by:

Witnessed by:

Signature
Print Name:

Signature
Print Name:

Signed at Framingham, MA, USA on this 21 day of Feb, 2014
(City, State and Nation)

Signature: 
Inventor's Name: Huawei QIU
Mailing Address: Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by:

Signature
Print Name:

Denise Honey

Signature
Print Name:

Julie J. Bird

Signed at Framingham, MA, USA on this 21 day of Feb, 2014
(City, State and Nation)

Signature: 
Inventor's Name: Clark PAN
Mailing Address: Bridgewater, New Jersey, 08807, US

Witnessed by:

Witnessed by:

Signature
Print Name:

Denise Honey

Signature
Print Name:

Julie J. Bird

Assignment
U.S. Serial No. 61/533,510 and
PCT Serial No. PCT/EP2012/003819

Sanofi Docket Nos. 5668USPSP and 5668WOPCT

Signed at Zürich, Switzerland on this 24th day of February, 2014
(City, State and Nation)

Signature:

Inventor's Name:

Mailing Address:


Benjamin KEBBLE

Freiestrasse 94, Zurich, 8032, Switzerland

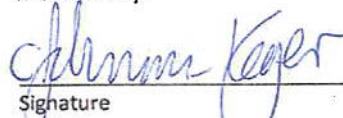
Witnessed by:


Signature

Print Name:

JULIA HEPP

Witnessed by:


Signature

Print Name:

CAROLINE JOHNSON-LEGER

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MASCHIO, Antonio
Maschio & Soames LLP
20 Carlton Crescent
Southampton SO15 2ET
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 21 February 2014 (21.02.2014)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 300232-20772WO	
International application No. PCT/EP2012/003819	International filing date (day/month/year) 12 September 2012 (12.09.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☒ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address SHANKARA, Shrinivas 17 Sheryl Dr Shrewsbury MA 01545 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☒ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address SHANKARA, Srinivas 17 Sheryl Dr Shrewsbury MA 01545 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:	☐ the International Preliminary Examining Authority ☒ the designated Offices concerned ☐ the elected Offices concerned ☐ other:
☒ the receiving Office ☐ the International Searching Authority ☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 75	Authorized officer Bouvier Alexandre e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
---	--

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MASCHIO, Antonio
Maschio & Soames LLP
20 Carlton Crescent
Southampton SO15 2ET
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 27 May 2013 (27.05.2013)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 300232-20772WO	
International application No. PCT/EP2012/003819	International filing date (day/month/year) 12 September 2012 (12.09.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address KEBBLE, Benjamin Freiestrasse 94 CH-8032 Zürich Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence GB
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: Please note the addition to the records of above-mentioned person as applicant for the US only and inventor for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☒ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Wagner Nathalie e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
Facsimile No. +41 22 338 89 75	

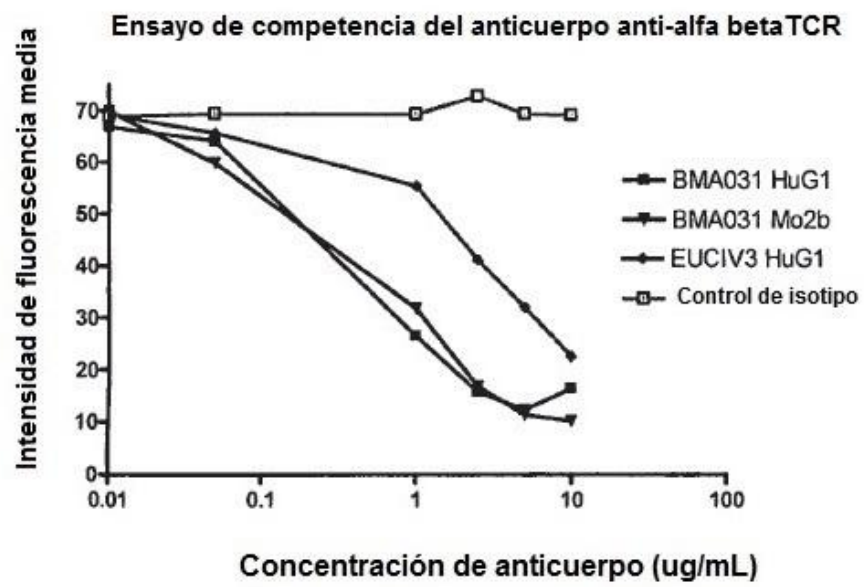


FIGURA 1

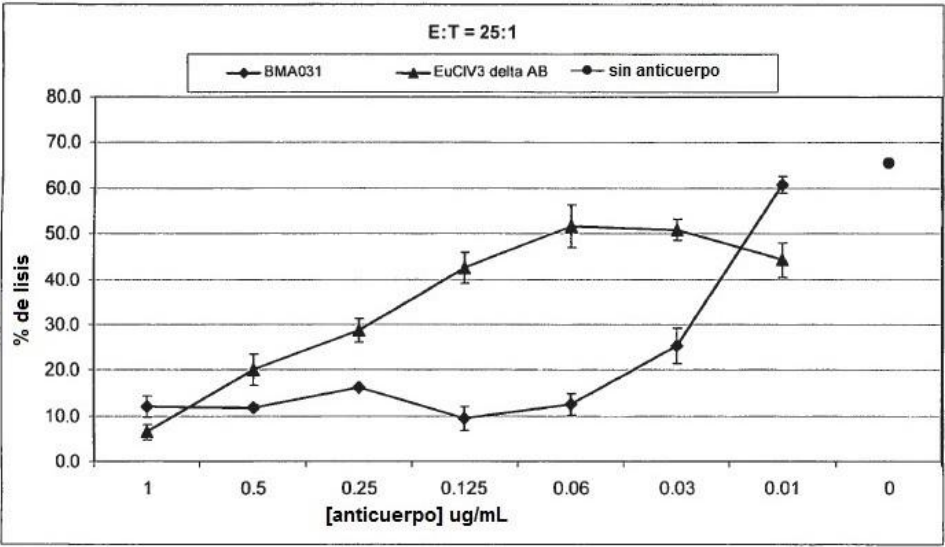


FIGURA 2

Ensayo de competencia contra GMP BMA031 Mo2b

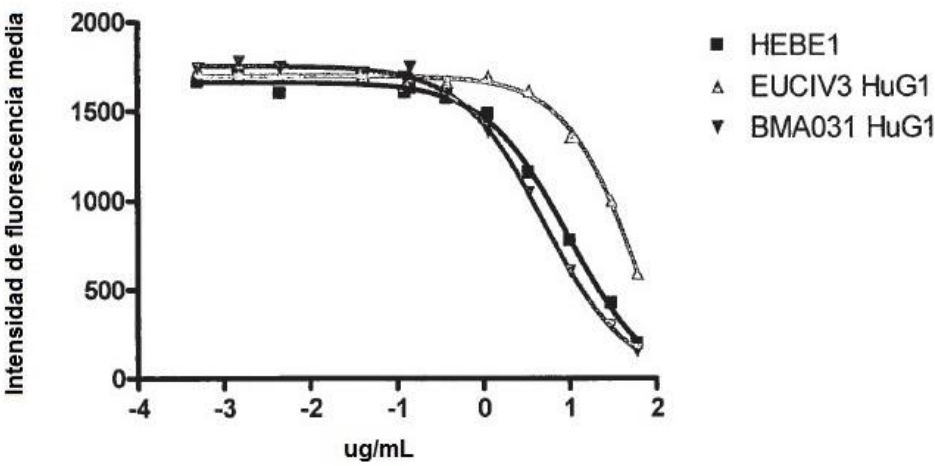


FIGURA 3

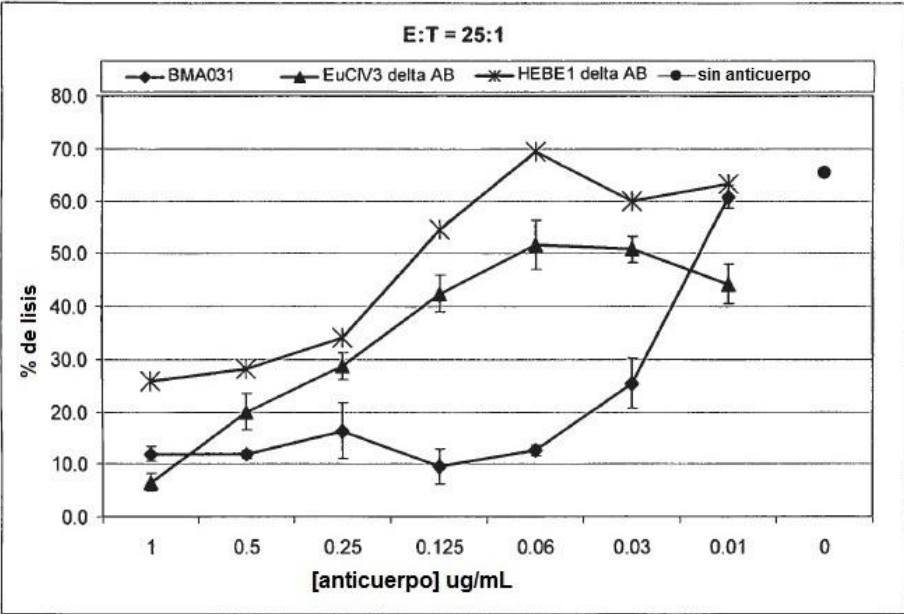


FIGURA 4

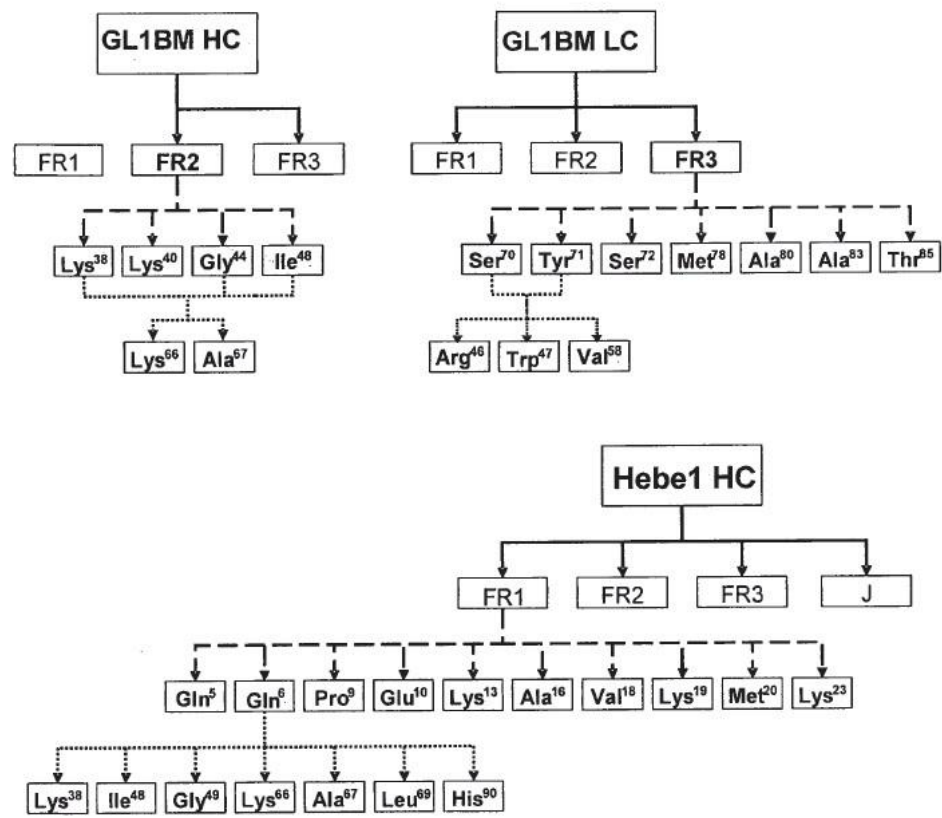


FIGURA 5

Velocidad de disociación de anticuerpos HEBE re-humanizados
Linfocitos T

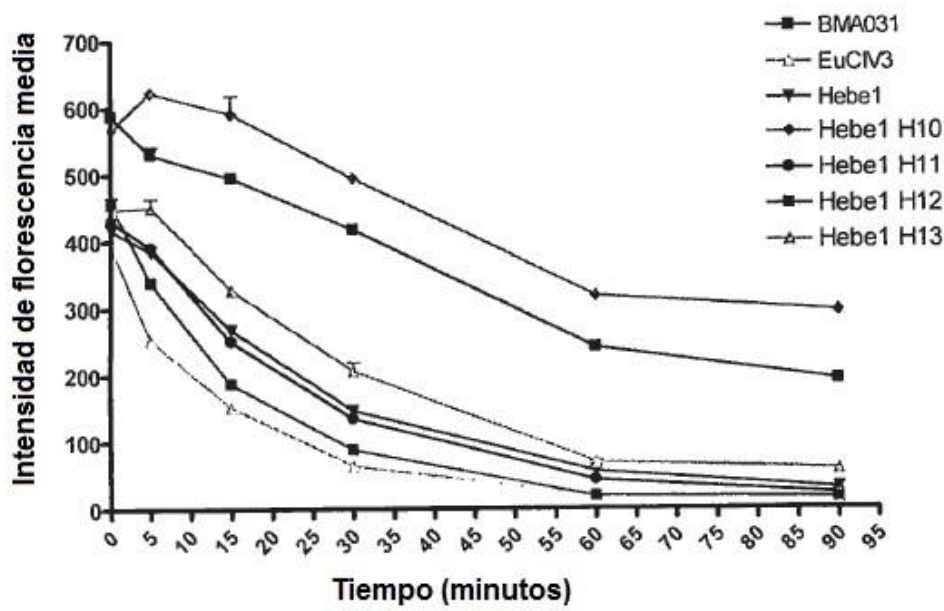


FIGURA 6

Velocidad de disociación de anticuerpos HEBE re-humanizados
Linfocitos T

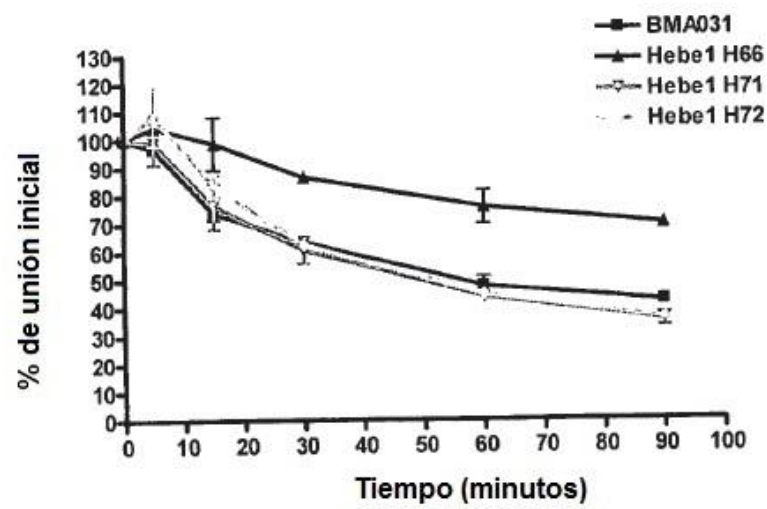


FIGURA 7

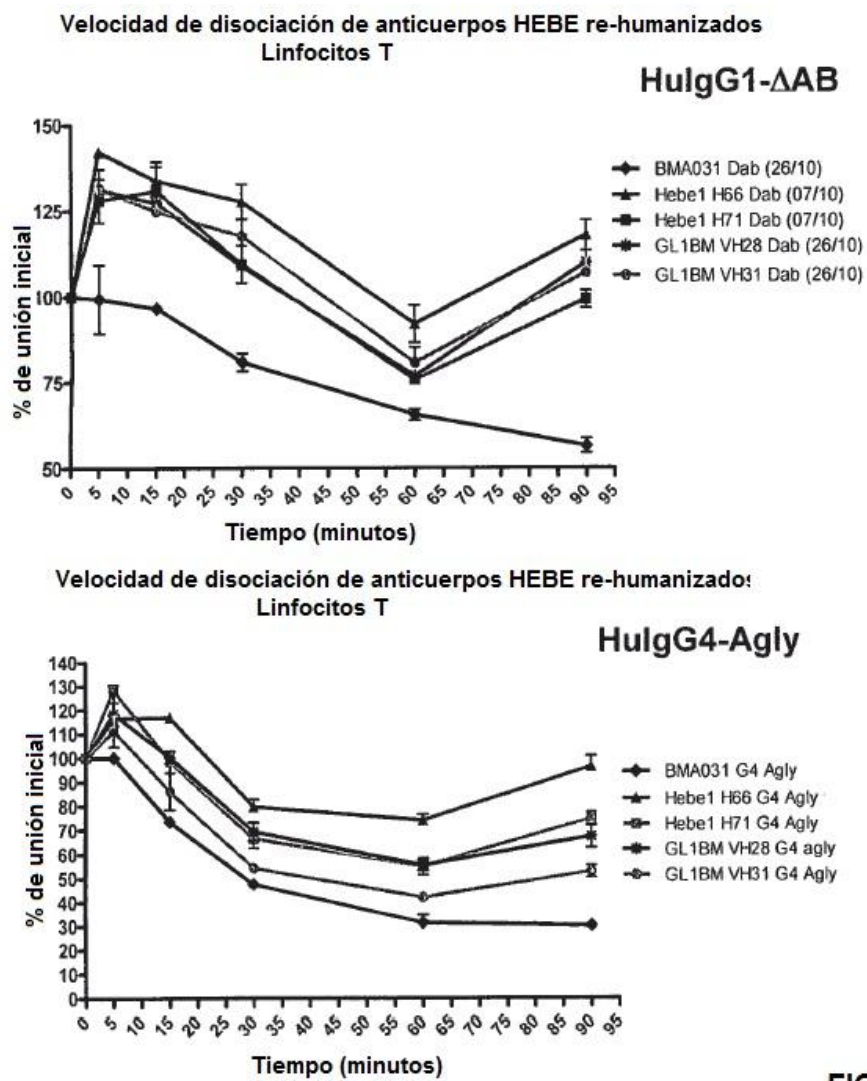


FIGURA 8

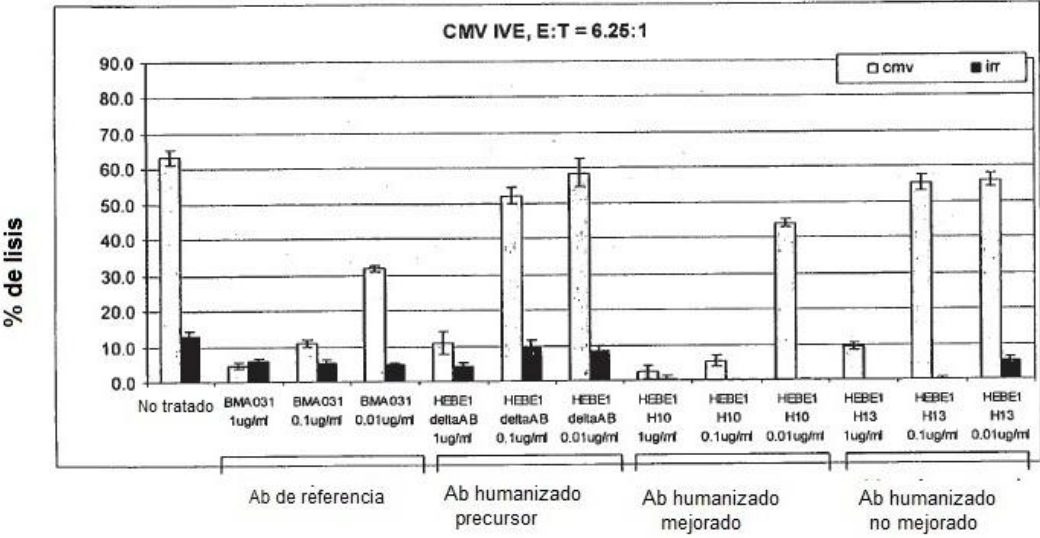


FIGURA 9

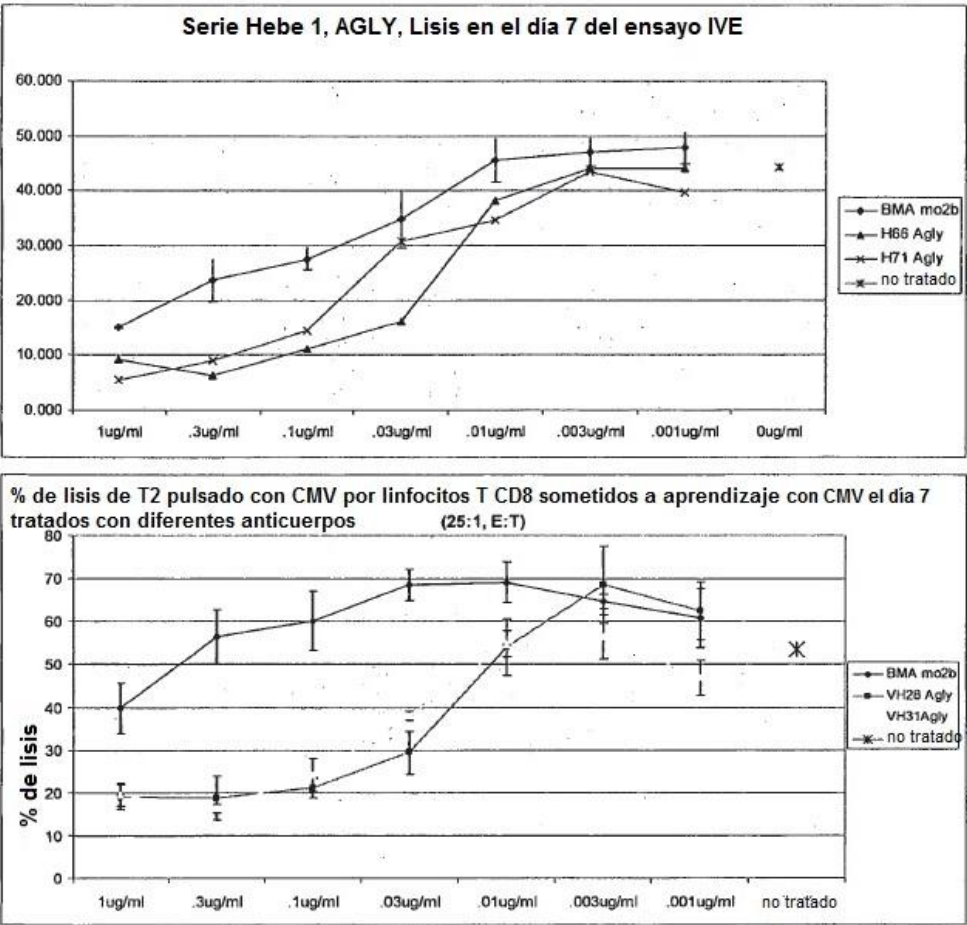


FIGURA 10

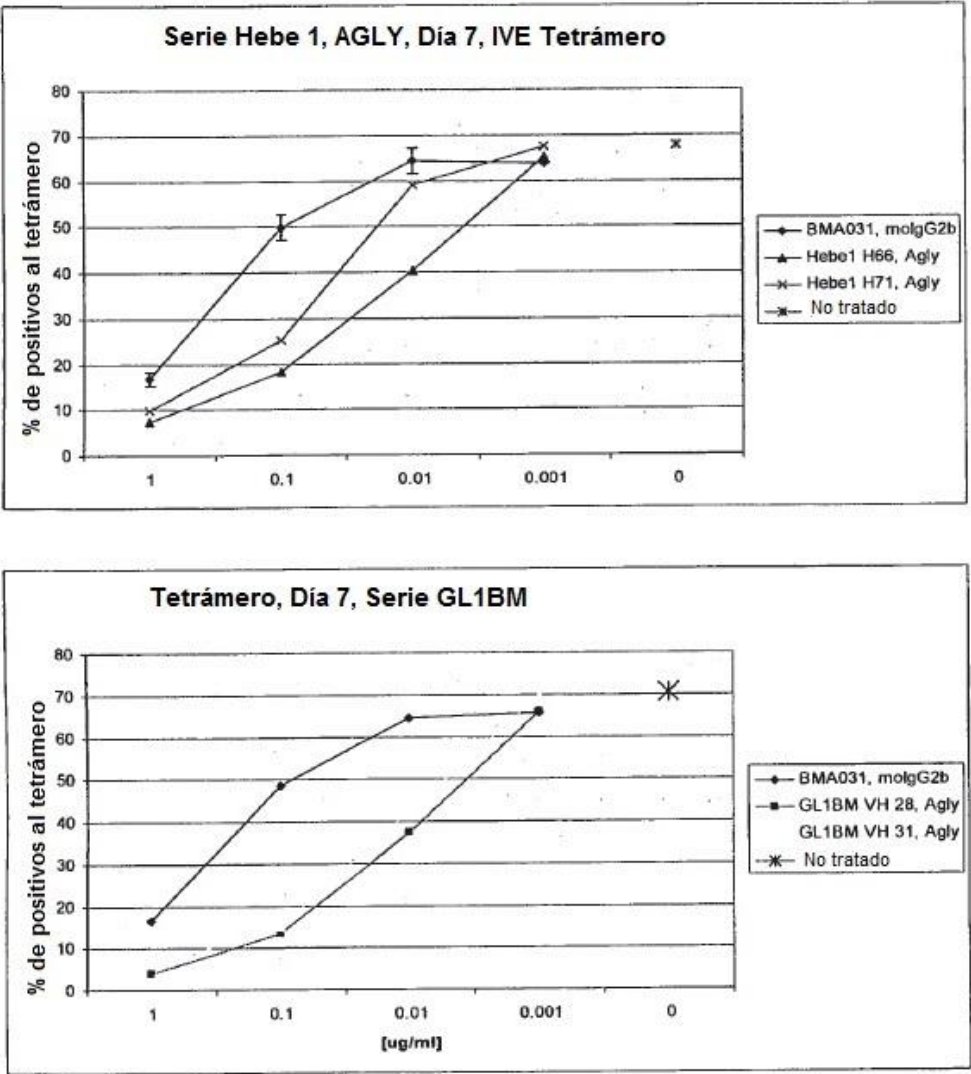


FIGURA 11

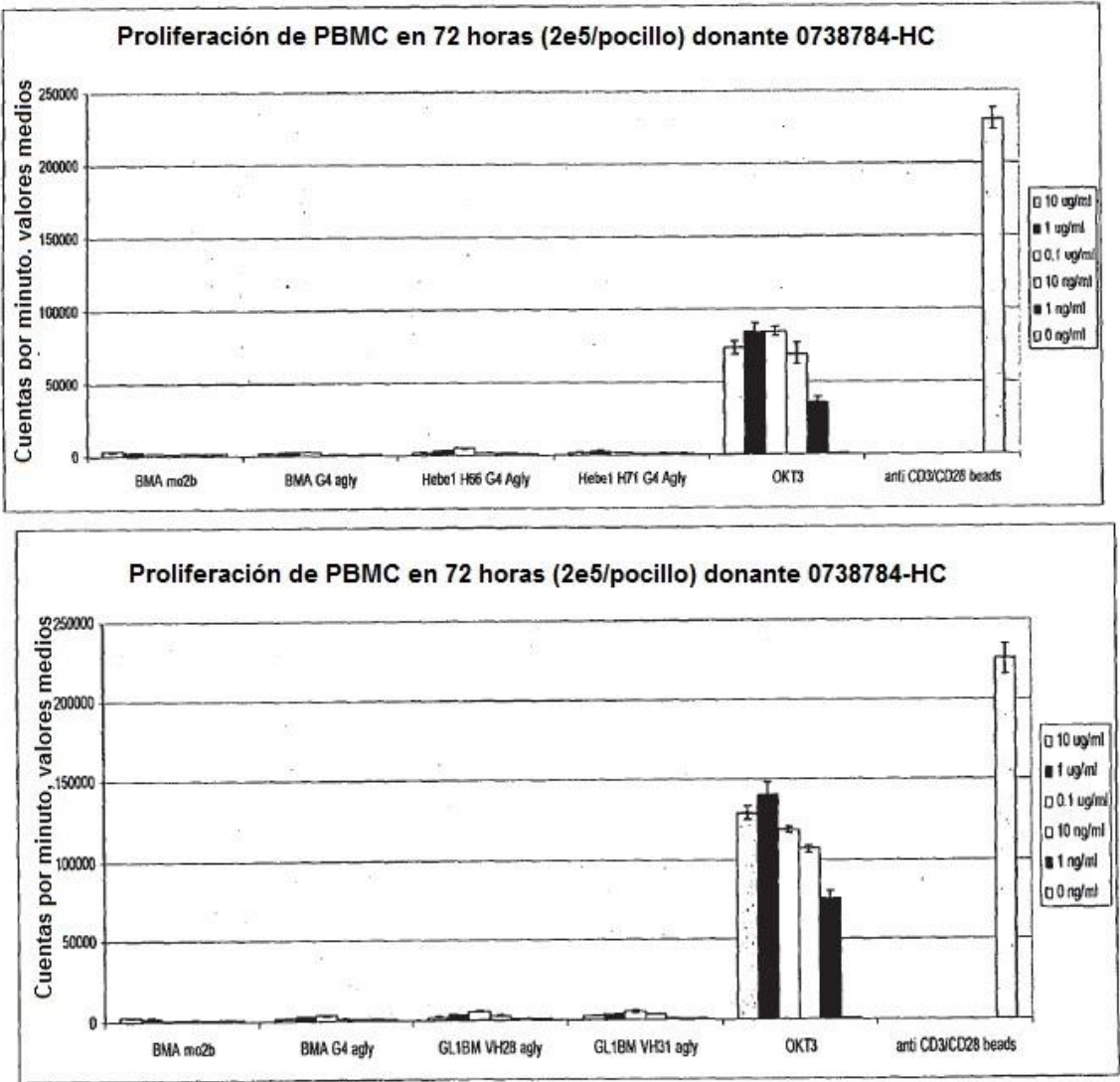


FIGURA 12

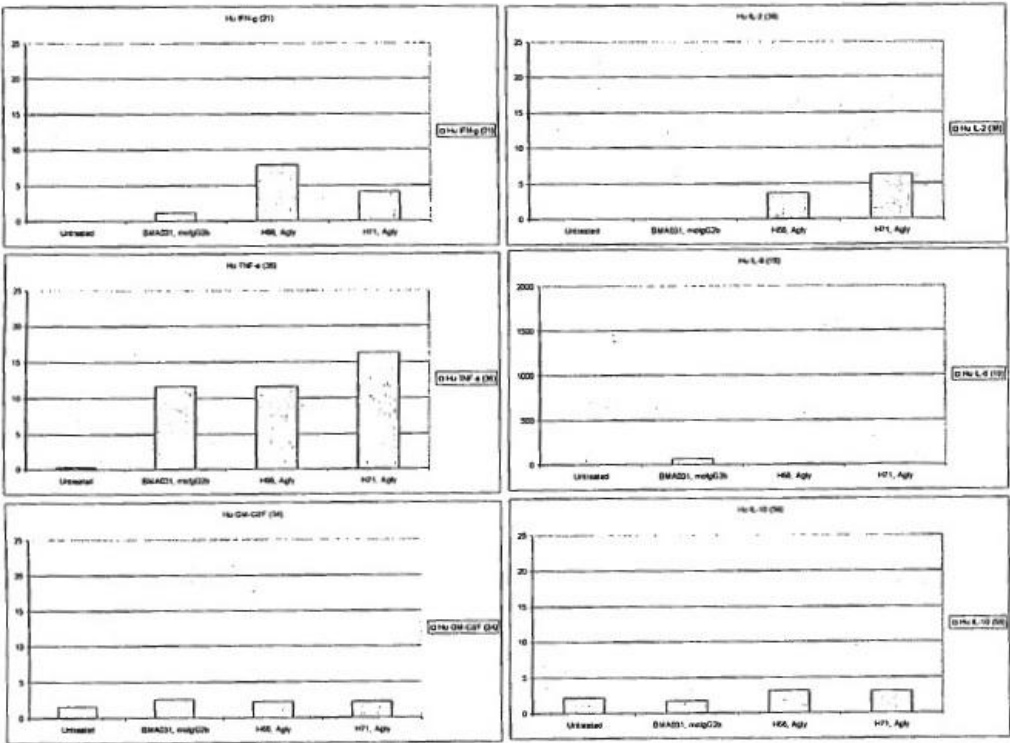


FIGURA 13

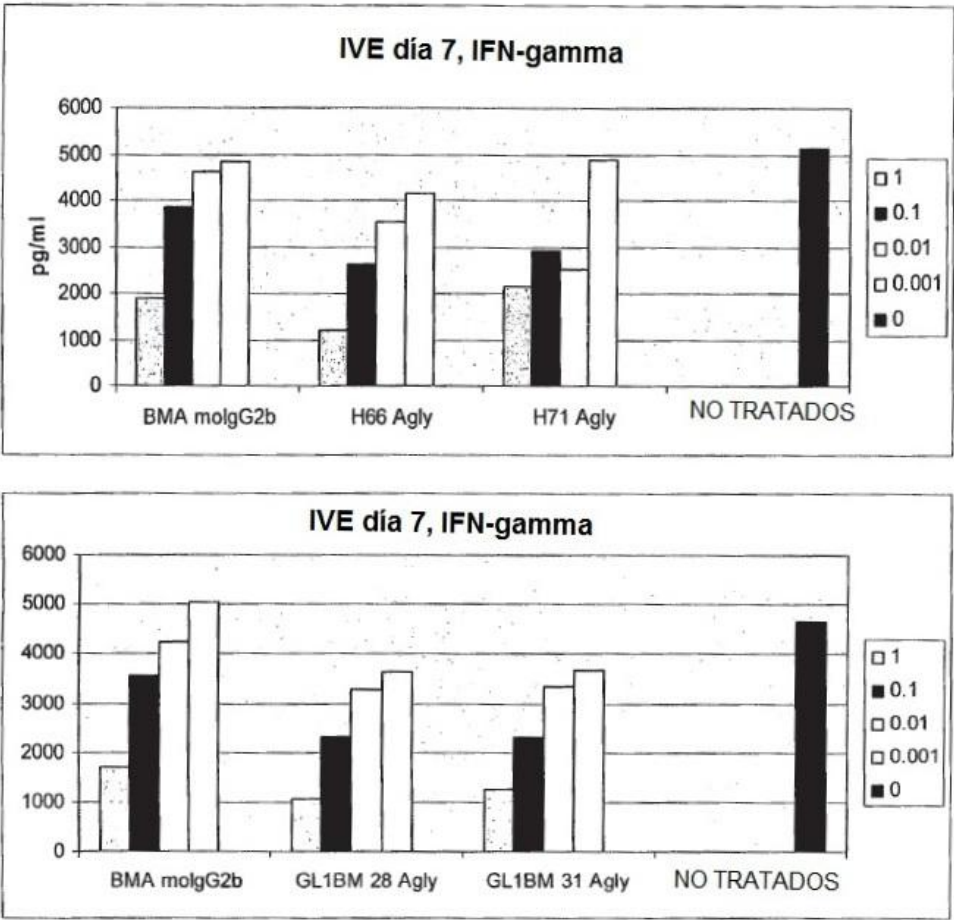


FIGURA 14

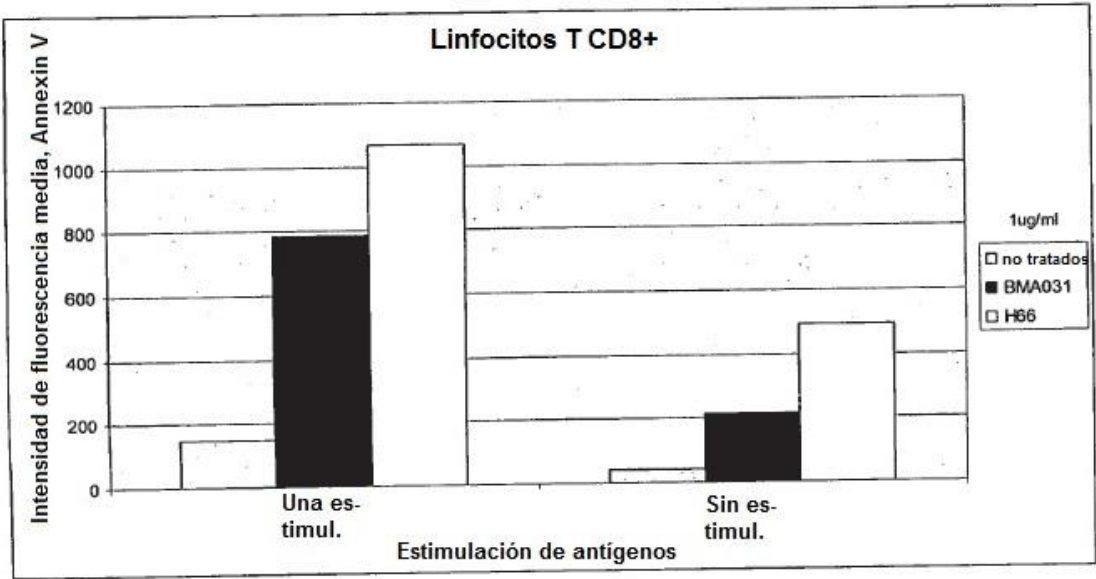


FIGURA 15

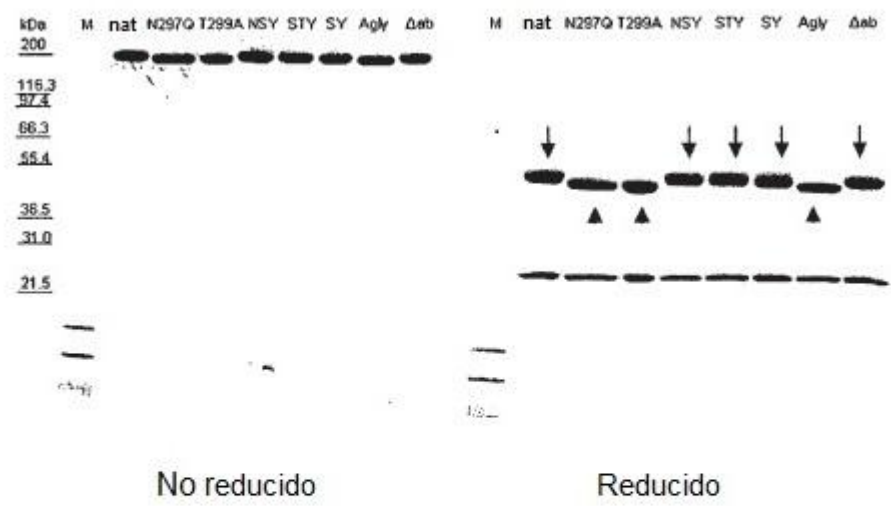
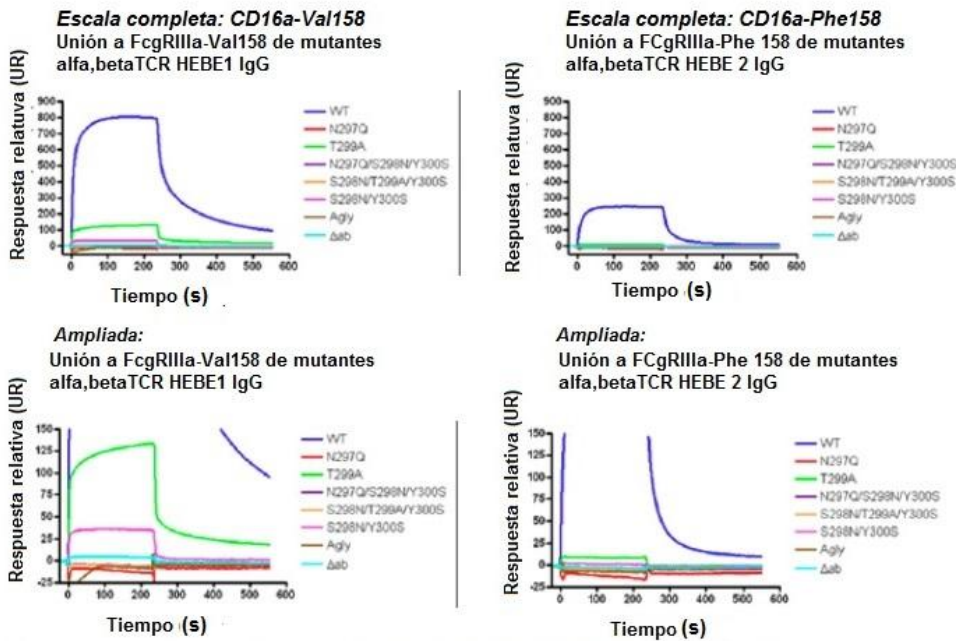


FIGURA 16

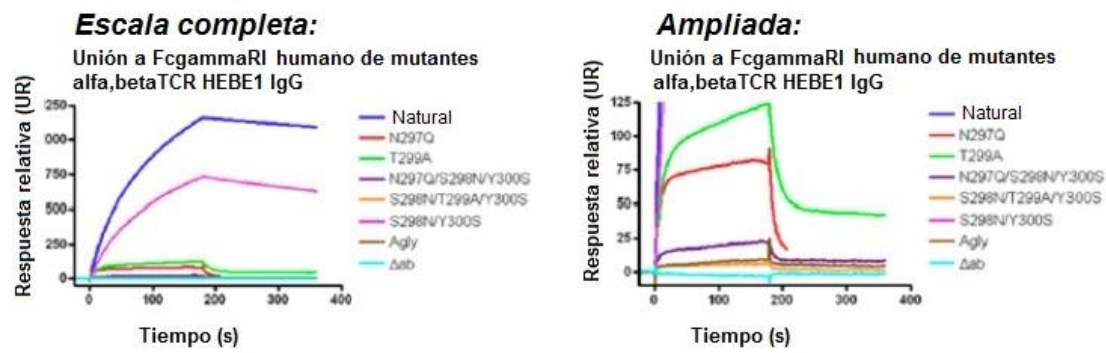
Unión a FcgammaRIIIa humano



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

FIGURA 17

Unión a FcγRI humano



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

FIGURA 18

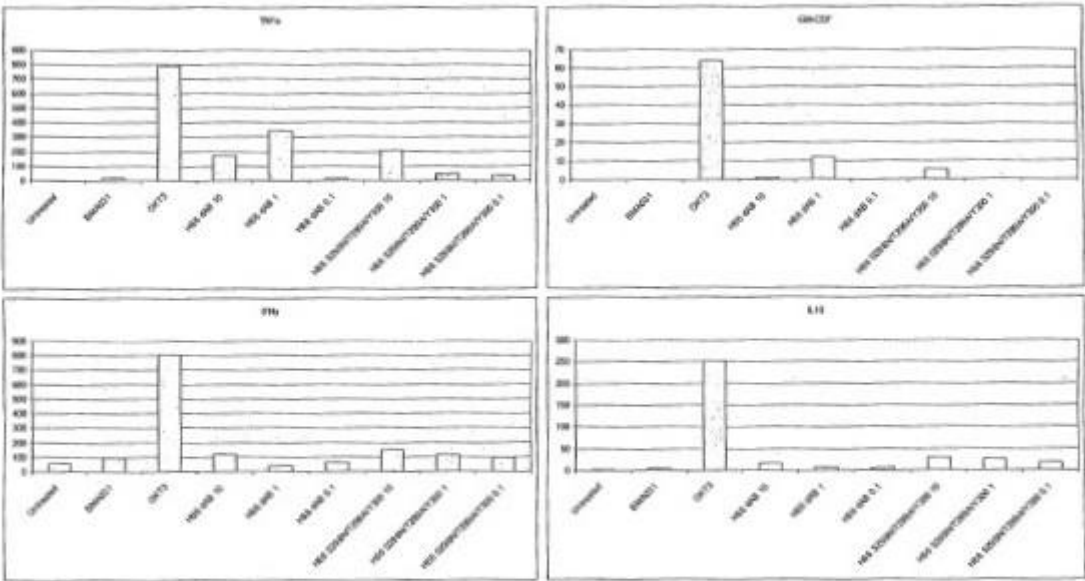


FIGURA 19

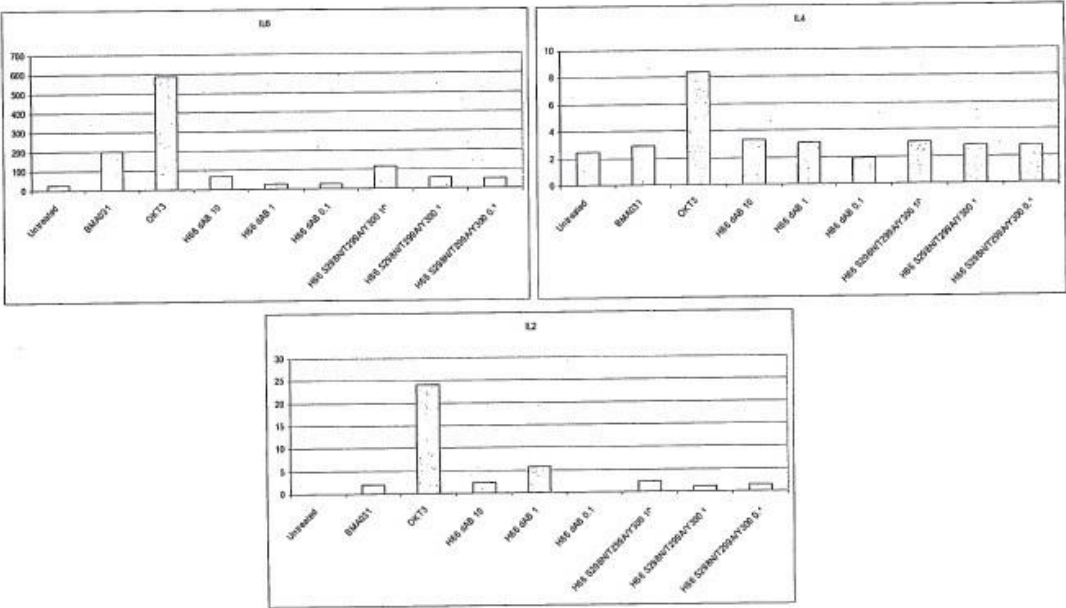


FIGURA 20

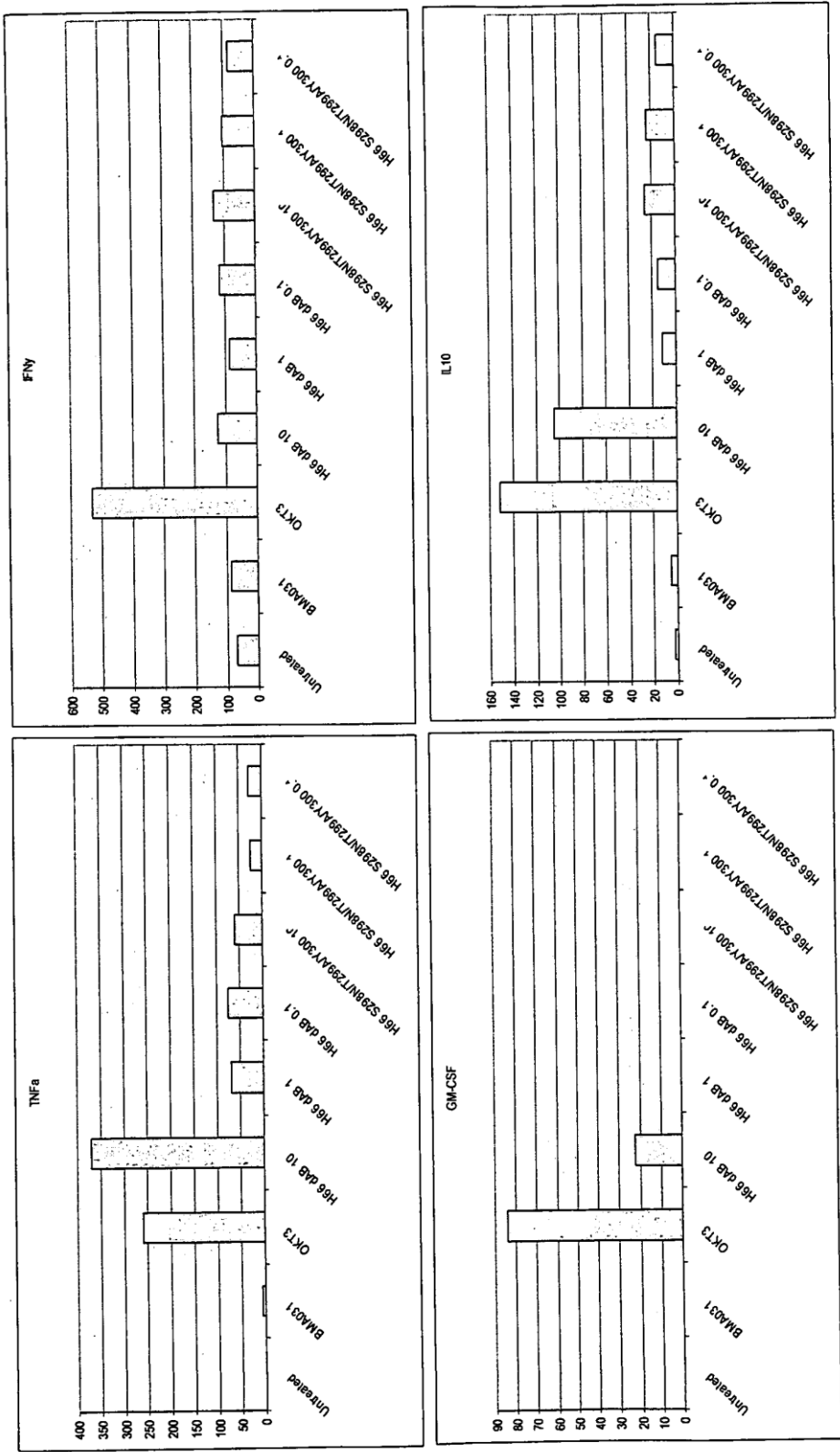


Figura 21

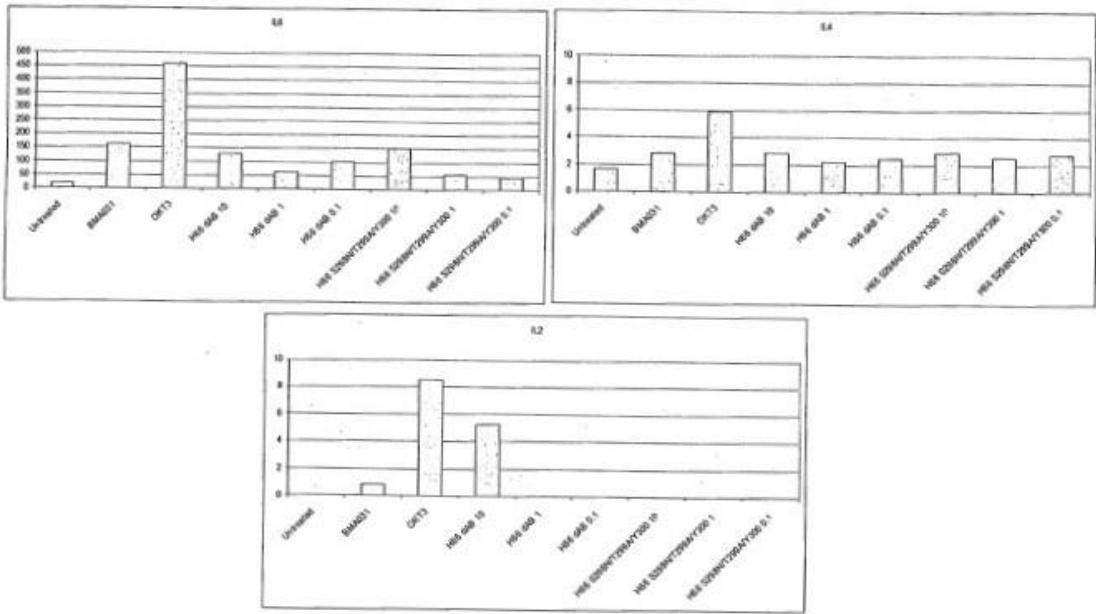
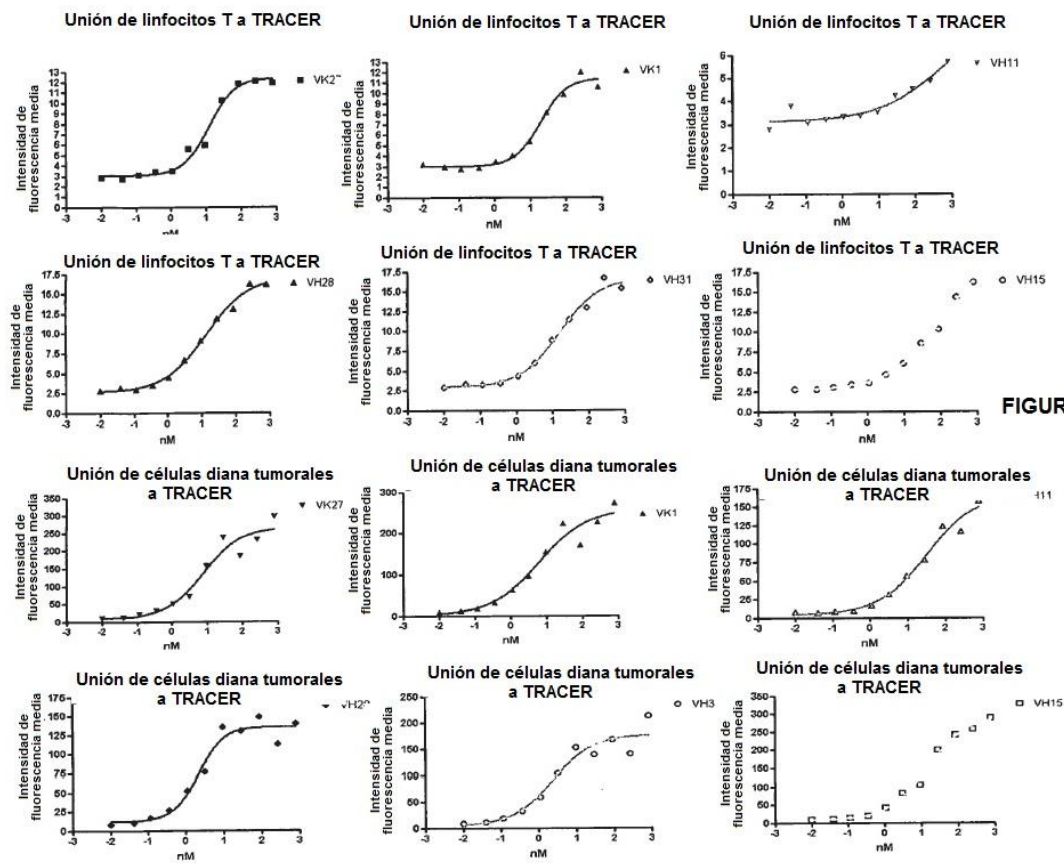


FIGURA 22



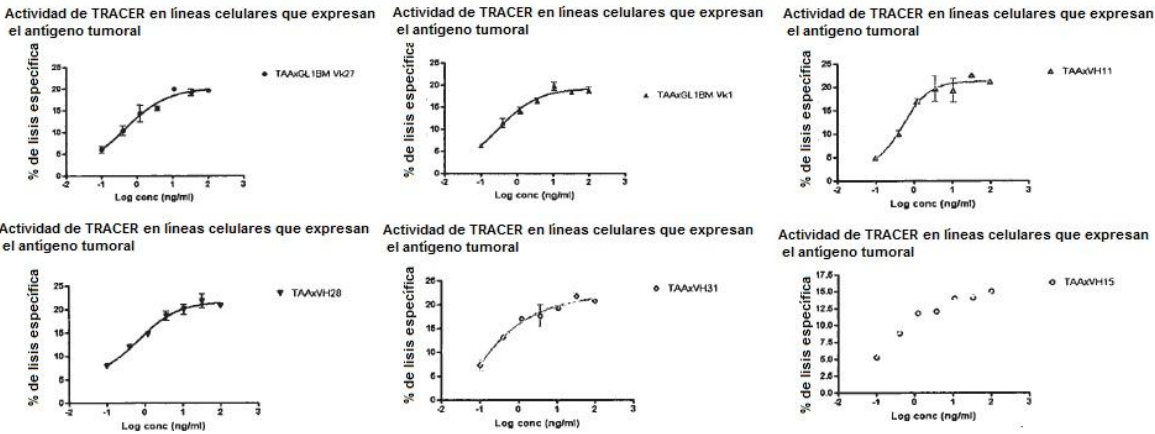


FIGURA 24

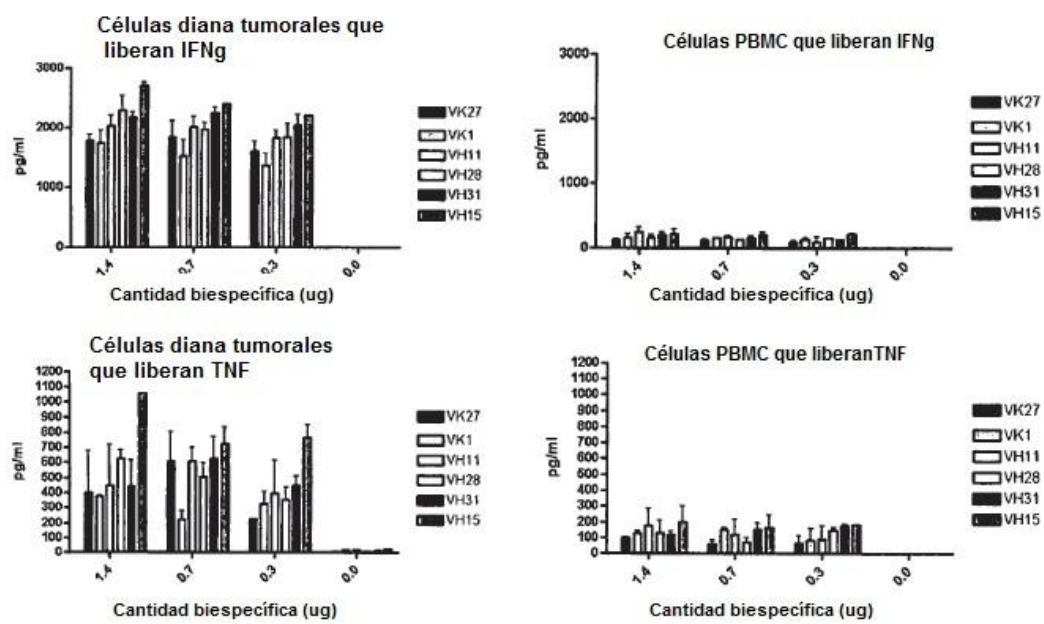


FIGURA 25

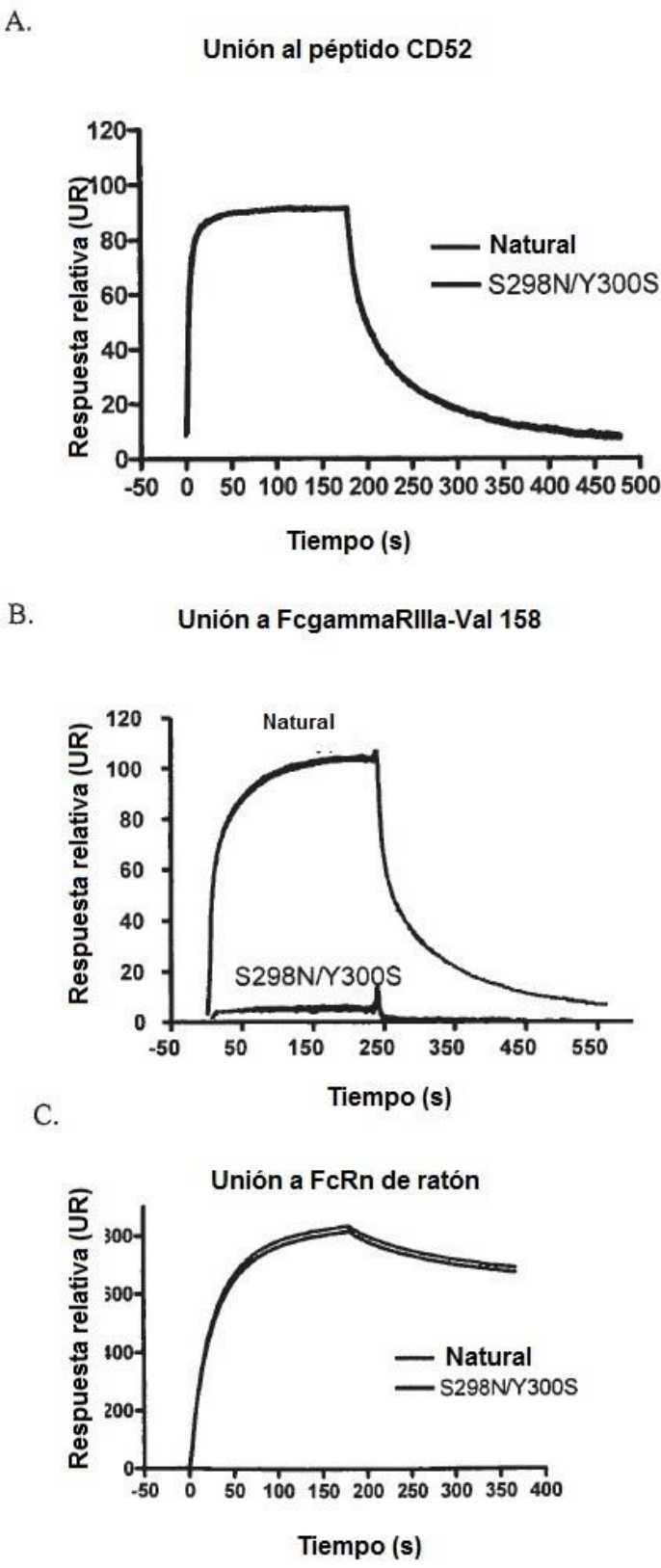


FIGURA 26

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 fábrica, 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 /or 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;

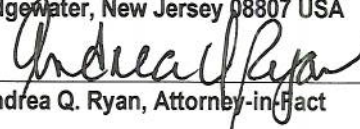
In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

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 **Bridge Water, New Jersey 08807 USA**

by


Andrea Q. Ryan, Attorney-in-Fact

C A S T E L L A N O S & C o .
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

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/300232.20772W0

<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

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

```
<220>
<223> Synthetic sequence: GL1BM Heavy chain variable domain
<400> 8
```

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

Página 7

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

225 230 Listado de secuencias 235 240

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

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

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

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

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 VHdeltaS

<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

<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

RESUMEN

La presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales humanizados que comprenden los CDRs del anticuerpo murina BMA031, que se une al complejo apTCR.CD3 y posee propiedades biológicas mejoradas.